

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Agrícola y Bromatología

**OBTENCIÓN DE ALIMENTOS E  
INGREDIENTES CON PROPIEDADES  
ANTIHIPERTENSIVAS A PARTIR DE  
LEGUMINOSAS GERMINADAS Y  
FERMENTADAS**

MEMORIA PRESENTADA POR:

**ROCÍO IVONNE LIMÓN GARDUZA**

PARA OPTAR AL GRADO DE:

**DOCTOR**

DIRECTORAS DE TESIS:

**Dra. JUANA FRÍAS AREVALILLO**

**Dra. CRISTINA MARTÍNEZ VILLALUENGA**

**Dra. ELENA PEÑAS POZO**

MADRID, 2015





MINISTERIO  
DE ECONOMÍA  
Y COMPETITIVIDAD



INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN (ICTAN)

**JUANA FRIAS AREVALILLO, INVESTIGADORA CIENTÍFICA, CRISTINA MARTÍNEZ VILLALUENGA, CIENTÍFICA TITULAR, Y ELENA PEÑAS POZO, INVESTIGADORA RAMÓN Y CAJAL, PERTENECIENTES AL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS,**

HACEN CONSTAR QUE:

El presente trabajo titulado **“Obtención de alimentos e ingredientes con propiedades antihipertensivas a partir de leguminosas germinadas y fermentadas”** ha sido realizado por la Licenciada Dña. Rocío Ivonne Limón Garduza bajo nuestra dirección en el Departamento de Caracterización, Calidad y Seguridad del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, 3 de marzo de 2015

Dra. Juana Frías Arevalillo

Dra. Cristina Martínez Villaluenga

Dra. Elena Peñas Pozo







FACULTAD DE  
CIENCIAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Visto Bueno: TUTORA

Dra. Esperanza Mollá  
Profesora Titular de Nutrición y Bromatología  
Departamento de Química Agrícola y Bromatología  
Universidad Autónoma de Madrid



---

**Los estudios realizados en esta Memoria han sido financiados por el proyecto de investigación AGL2010-16310 titulado “Procesos tecnológicos para la obtención de extractos funcionales de leguminosas con actividad antihipertensiva” proporcionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y el Ministerio de Economía y Competitividad (2010-2014).**

**La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una ayuda predoctoral de personal investigador en formación en el marco del programa “Junta de Ampliación de Estudios (JAE-PIF) en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC).**

**Durante la realización de esta Tesis Doctoral, Rocío I. Limón Garduza ha realizado estancias breves en el MTT Agrifood Research Finland, Biotechnology and Food Research, Jokioinen (Finlandia) y en el Departamento de Ciencias Farmacológicas y Biomoleculares de la Universidad de Milán (Italia).**

---



---

## APORTACIONES CIENTÍFICAS

---



## **Aportaciones Científicas**

La presente Memoria ha dado lugar a las siguientes aportaciones:

### ***Publicaciones Científicas incluidas en el Journal Citation Report del Institute for Scientific Information (ISI)***

1. Torino, M.I., **Limón, R.I.**, Martínez-Villaluenga, C., Mäkinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde, C., Frias, J. 2013. Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chemistry*, 136, 1030-1037.
2. **Limón, R.I.**, Peñas, E., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J. 2014. Role of elicitation on the health-promoting properties of kidney bean sprouts. *LWT-Food Science and Technology*, 56, 328-334.
3. **Limón, R.I.**, Peñas, E., Torino, M.I., Martínez-Villaluenga, C., Dueñas, M., Frias, J. 2015. Fermentation enhances the content of bioactive compounds in kidney bean extracts. *Food Chemistry*, 172, 343-352.
4. Dueñas, M., Martínez-Villaluenga, C., **Limón, R.I.**, Peñas, E., Frias, J. 2015. Effect of germination and elicitation on phenolic composition and bioactivity of kidney beans. *Food Research International*, 70, 55-63.

### ***Presentación a congresos y resúmenes publicados***

1. Torino, M.I., **Limón, R.I.**, Martínez-Villaluenga, C., Mäkinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde, C., Frias, J. "Compuestos antihipertensivos en extractos de lenteja fermentada". 3<sup>er</sup> Congreso Internacional en Nutrición y Tecnología de los Alimentos, CINTA y EXPO, 2012, Mendoza (Argentina).

2. **Limón, R.I.**, Peñas, E., Martínez-Villaluenga, C., Uberti, F., Restani, P., Frias, J. "Inmunoreactivity reduction and antihypertensive effect enhancement of lentils by fermentation". 2<sup>do</sup> Congreso Internacional en Seguridad Alimentaria, ACOFESAL, 2013, Madrid (España).
3. **Limón, R.I.**, Torino, M.I., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J. "Bioactive compounds and microbiological analysis in fermented kidney beans". IV International Symposium on Lactic Acid Bacteria: Food, Health and Applications, CERELA-CONICET, 2013, Tucumán (Argentina).
4. **Limón, R.I.**, Martínez-Villaluenga, C., Frias, J. "Effect of germination with glutamic acid on the potential antihypertensive and antioxidant activities of kidney bean extracts". Euro Food Chem XVII, 2013, Estambul (Turquía).



---

## ÍNDICE

---



## Índice

<b>1.</b>	<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Introducción .....</b>	<b>5</b>
2.1	Hipertensión: importancia e incidencia.....	5
2.2	Patogénesis y tratamiento de la hipertensión .....	7
2.3	Aproximaciones dietéticas en la prevención y control de la hipertensión .....	14
2.4	Las leguminosas y su papel en el control de la hipertensión .....	17
2.5	Las leguminosas como fuente de compuestos antihipertensivos .....	19
2.5.1	Proteínas.....	19
2.5.2	Péptidos bioactivos .....	21
2.5.3	Polifenoles.....	26
2.5.4	Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA) .....	32
2.6	Empleo de procesos tecnológicos para favorecer la síntesis de compuestos bioactivos en las leguminosas.....	34
2.6.1	Germinación.....	34
2.6.1.1	Modificación de los constituyentes de las leguminosas durante la germinación. ....	34
2.6.1.2	Empleo de elicitores durante la germinación para maximizar el contenido en compuestos bioactivos y las propiedades biológicas de las leguminosas. ....	38
2.6.2	Fermentación. ....	39
<b>3.</b>	<b>Interés y objetivos .....</b>	<b>47</b>
<b>4.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>51</b>

4.1	<b>Efectividad del tratamiento con elicitores para mejorar la composición de fitoquímicos y la potencial actividad antihipertensiva de germinados de judía (<i>P. vulgaris</i> var. pinto).</b>	51
	Publicación I. El papel de los elicitores en las propiedades promotoras de la salud de germinados de judía. ....	53
	Publicación II. Efecto de la germinación y el uso de elicitores en la composición fenólica y bioactividad de judía. ....	63
4.2	<b>Mejora del contenido de compuestos bioactivos y de las propiedades biológicas de leguminosas (<i>L. culinaris</i> var. castellana y <i>P. vulgaris</i> var. pinto) mediante fermentación. Obtención de ingredientes funcionales dirigidos a la prevención de la hipertensión.</b>	75
	Publicación III. Propiedades antioxidantes y antihipertensivas de lentejas fermentadas en estados líquido y sólido. ....	77
	Publicación IV. La fermentación mejora el contenido de compuestos bioactivos en extractos de judía.....	87
5.	<b>Discusión general</b>	101
5.1	<b>Efectividad del tratamiento con elicitores para mejorar la composición de fitoquímicos y la potencial actividad antihipertensiva de germinados de judía (<i>P. vulgaris</i> var. pinto).</b>	102
5.2	<b>Mejora del contenido de compuestos bioactivos y de las propiedades biológicas de judía y lenteja mediante fermentación. Obtención de ingredientes funcionales dirigidos a la prevención de la hipertensión.</b>	112
6.	<b>Conclusiones</b>	127
7.	<b>Bibliografía</b>	131

---

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

---



## Abreviaturas y acrónimos

En este apartado se detallan las abreviaturas y acrónimos utilizados en esta Memoria, así como sus correspondientes significados.

<b>AS:</b>	Asparagina sintetasa
<b>AT1/AT2:</b>	Receptores de angiotensina II
<b>ATP:</b>	Adenosin trifosfato
<b>BAL:</b>	Bacterias ácido lácticas
<b>BK:</b>	Receptor de bradiquinina
<b>COX-2:</b>	Ciclooxigenasa 2
<b>DAO:</b>	Diamino oxidasa
<b>DASH:</b>	Aproximaciones dietéticas para prevenir la hipertensión
<b>DPPH:</b>	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
<b>ECA:</b>	Enzima convertidora de angiotensina I
<b>ECV:</b>	Enfermedades cardiovasculares
<b>eNOS:</b>	Óxido nítrico sintasa endotelial
<b>ERO:</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>GABA:</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GABA-T:</b>	GABA transaminasa
<b>GD:</b>	Glutamato descarboxilasa
<b>GAE:</b>	Equivalentes de ácido gálico
<b>GS-Fd:</b>	Glutamato sintetasa dependiente de ferredoxina

<b>HPLC-ESI-MS:</b>	Cromatografía de alta resolución acoplada a espectrometría de masas de electrospray
<b>HSP70:</b>	Proteína de shock térmico 70
<b>IC<sub>50</sub>:</b>	Concentración inhibitoria del 50% de la actividad enzimática
<b>IFN-<math>\gamma</math>:</b>	Interferón gamma
<b>ICAM-1:</b>	Molécula de adhesión intercelular-1
<b>iNOS:</b>	Óxido nítrico sintasa inducible
<b>IL-6:</b>	Interleuquina 6
<b>IL-17:</b>	Interleuquina 17
<b>L-DOPA:</b>	L-3,4-dihidroxifenilalanina
<b>LDL:</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>LPO:</b>	Lipooxigenasa
<b>NADH:</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
<b>NADPH:</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
<b>Nano-HPLC-MS:</b>	Nano cromatografía de alta resolución acoplada a espectrometría de masas
<b>NF-<math>\kappa\beta</math>:</b>	Factor de transcripción nuclear $\kappa\beta$
<b>NQO1:</b>	NADPH quinona oxidoreductasa 1
<b>ON:</b>	Óxido nítrico
<b>OMS:</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ORAC:</b>	Capacidad atrapadora de radicales de oxígeno
<b>PCR:</b>	Proteína C reactiva



<b>PGI<sub>2</sub>:</b>	Prostaciclina
<b>PPAR:</b>	Receptor activador del proliferador de peroxisomas
<b>PXR:</b>	Receptor X del pregnano
<b>S:</b>	Coeficiente de sedimentación
<b>SSADH:</b>	Succinato semialdehído deshidrogenasa
<b>SRAA:</b>	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
<b>TGF-<math>\beta</math>:</b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>UFC:</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>VCAM-1:</b>	Molécula de citoadhesión vascular-1



---

## SEMILLAS Y SU DENOMINACIÓN BOTÁNICA

---



## **Semillas y su denominación botánica.**

En este apartado se detalla el nombre común de las semillas mencionadas en esta Memoria, así como su denominación botánica (Rehm, 1994).

### **A**

Altramuz azul:	<i>Lupinus angustifolius</i> L.
Altramuz blanco:	<i>Lupinus albus</i> L.
Altramuz amarillo:	<i>Lupinus luteus</i> L.
Arroz:	<i>Oryza sativa</i> L.

### **B**

Brócoli:	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> L.
----------	---

### **C**

Centeno:	<i>Secale cereale</i> L.
----------	--------------------------

### **G**

Garbanzo:	<i>Cicer arietinum</i> L.
Guisante:	<i>Pisum sativum</i> L.

### **H**

Haba:	<i>Vicia faba</i> L.
-------	----------------------

### **J**

Judías adzuki:	<i>Vigna angularis</i>
Judía amarga:	<i>Parkia speciosa</i>
Judía común:	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Judía carilla:	<i>Vigna sinensis</i> L.
Judía espárrago/rabiza:	<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp
Judía:	<i>Vigna subterranea</i> L.
Judía de Jamapa:	<i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>Jamapa</i>
Judía de Lima:	<i>Phaseolus lunatus</i> L.
Judía mungo:	<i>Vigna radiata</i> L. / <i>Phaseolus aureus</i> L.

Judía negra:	<i>Phaseolus vulgaris</i> var. Tolosana <i>Phaseolus vulgaris</i> var. mexicana roja <i>Phaseolus vulgaris</i> var. Generic <i>Phaseolus vulgaris</i> var. Jaguar
Judía pinta:	<i>Phaseolus vulgaris</i> var. pinto
Judía roja:	<i>Phaseolus vulgaris</i> var. small red
Judía Rose coco:	<i>Phaseolus vulgaris</i> var. Rose coco
Judía terciopelo:	<i>Mucuna pruriens</i>
Judía yam de Africa:	<i>Sphenostylis stenocarpa</i>

## L

Lenteja:	<i>Lens culinaris</i> L. var. castellana
----------	--

## M

Mijo:	<i>Setaria italica</i> L.
-------	---------------------------

## P

Pepino:	<i>Cucumis sativus</i> L.
---------	---------------------------

## Q

Quinchoncho:	<i>Cajanus cajan</i> L. Millsp
--------------	--------------------------------

## S

Soja:	<i>Glycine max</i> L.
-------	-----------------------

## T

Trigo:	<i>Triticum aestivum</i> L.
--------	-----------------------------

---

## RESUMEN

---





## 1. Resumen

La hipertensión es una patología que afecta aproximadamente a un tercio de la población adulta y constituye uno de los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares, lo que supone un grave problema de salud pública mundial. La prevención primaria basada en el ejercicio físico y una dieta saludable representa una estrategia segura, viable y económica para controlar la hipertensión. Por ello, se están destinando notables esfuerzos en investigación para desarrollar alimentos funcionales que sean fácilmente incorporados a la dieta y que contribuyan al control y prevención de la hipertensión. Las leguminosas son uno de los alimentos básicos de la Dieta Mediterránea y se ha demostrado que su consumo frecuente está relacionado con la reducción de la presión arterial de individuos normotensos e hipertensos. Sin embargo, su utilización industrial para la obtención de alimentos funcionales no ha sido explorada hasta la fecha. La germinación y la fermentación pueden potenciar la calidad funcional de leguminosas a través de la mejora del contenido y la composición de compuestos bioactivos.

La presente Tesis propone estudiar la efectividad de la germinación con elicitores y la fermentación en estados sólido y líquido con el objetivo de desarrollar alimentos e ingredientes con propiedades antihipertensivas derivados de lentejas castellanas y judías pintas.

El proceso de germinación en judías se desarrolló utilizando diferentes elicitores para modificar el contenido y composición en fitoquímicos con propiedades antihipertensivas como los compuestos fenólicos y el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Se confirmó que su efectividad era dependiente del tiempo de germinación y del tipo de tratamiento. La aplicación de ácido glutámico durante 8 días condujo a una mayor acumulación de compuestos fenólicos totales y de GABA en los germinados, que se reflejó en una mayor actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA), sin verse modificada la actividad antioxidante.

Posteriormente, se llevó a cabo un estudio pormenorizado de los compuestos fenólicos de los germinados de 8 días de judías tratados con ácido ascórbico, ácido fólico

y ácido glutámico donde se observó que estos elicitores modifican la composición y actividad inhibidora de la ECA de la fracción fenólica. Todos los elicitores ocasionaron un descenso de la concentración total de compuestos fenólicos, aunque algunos glucósidos de flavanonas y flavonoles aumentaron. En todos los casos, la actividad inhibidora de la ECA de la fracción fenólica de los germinados fue superior con el empleo de elicitores, destacando especialmente el tratamiento con ácido fólico.

El proceso de fermentación en estados líquido y sólido mejoró las propiedades antihipertensivas de lentejas castellanas, si bien ejercieron distinta influencia sobre el contenido de fitoquímicos y actividades antioxidante e inhibidora de la ECA de los extractos hidrosolubles obtenidos. La fermentación natural de lentejas maximizó la síntesis de GABA y de péptidos solubles, y produjo elevadas actividades antioxidante e inhibidora de la ECA. En judías pintas, la fermentación sólida causó el mayor aumento del contenido total de compuestos fenólicos solubles, de ácidos fenólicos y de la actividad antioxidante, mientras que la fermentación líquida fue el proceso más eficaz en la producción de GABA, de derivados hidroxycinámicos y potenció la actividad inhibidora de la ECA.

En conjunto, estos estudios confirman la eficacia de los procesos de germinación y fermentación de lentejas castellanas y judías pintas en el desarrollo de alimentos e ingredientes con potenciales propiedades antihipertensivas que pueden tener una amplia aplicación en la industria alimentaria, con los consiguientes beneficios saludables y repercusiones socioeconómicas.

---

## INTRODUCCIÓN

---



## **2. Introducción**

### **2.1 Hipertensión: importancia e incidencia**

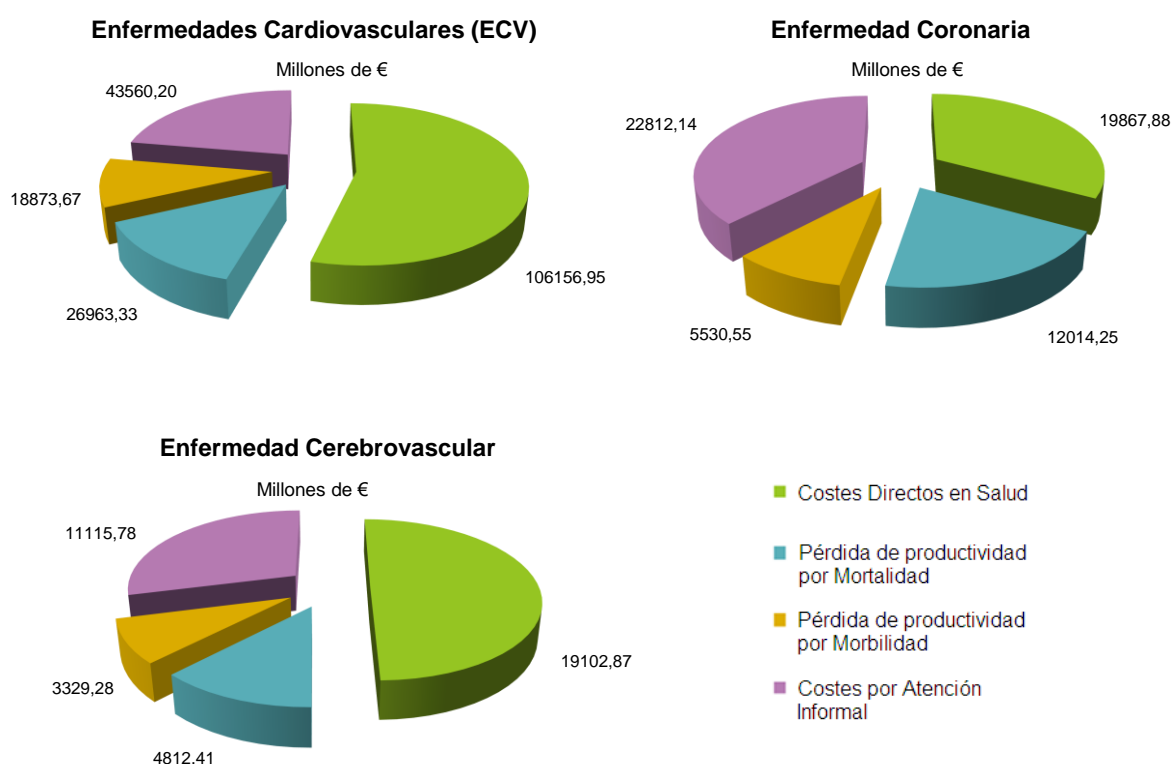
La hipertensión es uno de los problemas más importantes de salud pública a nivel mundial ya que constituye el principal factor de riesgo en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares (ECV) y es responsable del 16,5% del total de las muertes anuales (OMS, 2013).

La hipertensión se produce debido a la elevación crónica de la presión de la sangre proveniente del corazón contra las paredes de los vasos sanguíneos. Se caracteriza por una presión sistólica igual o superior a 140 mm Hg y una presión diastólica igual o superior a 90 mm Hg. Esta patología se clasifica en dos categorías: esencial o primaria y secundaria. La hipertensión esencial generalmente no está producida por una única causa específica e identificable sino que se debe a un conjunto de factores, intrínsecos (herencia genética y edad) y extrínsecos (estrés, estilo de vida y ambientales). Entre los factores extrínsecos cabe destacar los factores de riesgo conductuales como el consumo de tabaco, la ingesta de alcohol, el sobrepeso, la dieta no saludable y el sedentarismo, que son responsables de aproximadamente un 80% de los casos de hipertensión (OMS, 2013). La hipertensión esencial constituye el 95% de los casos diagnosticados y el 50% de estos casos es sensible a la sal (Weinberger y col., 2001). La hipertensión secundaria se manifiesta como consecuencia de otra patología, como la hiperlipemia, el sobrepeso y la obesidad (Anderson y Major, 2012), la diabetes (Chiasson y col., 2003; McCue y col., 2005) y las enfermedades renales o trastornos de las glándulas suprarrenales (Chen y col., 2009).

Hasta hace unos años, la hipertensión se ha relacionado con la edad avanzada, sin embargo, su incidencia está aumentando de forma significativa entre la población más joven. Se estima que la hipertensión afecta al menos a un tercio de la población adulta y en el 50% de los casos el individuo hipertenso desconoce serlo (Chen y col, 2009; OMS, 2013). Por continentes, la hipertensión afecta más a la población africana y en menor proporción al continente americano, prevalencia que parece estar asociada a países con rentas más bajas y, en todos los casos, afecta en mayor medida a los hombres que a las

mujeres (OMS, 2013). En España, el 34% de la población padece hipertensión arterial y su incidencia se eleva al 67% entre las personas mayores de 65 años. Es de destacar que en 2008, el 27% de los hombres y el 18,6% de las mujeres mayores de 25 años fueron diagnosticados de hipertensión, individuos que, a su vez, presentaron indicios de sobrepeso y diabetes incrementándose, con ello, el riesgo de presentar ECV (OMS, 2013).

En la actualidad, la presión arterial elevada es la causa inicial responsable del 45% de las muertes en el mundo por cardiopatías y del 51% por accidente cerebrovascular (OMS, 2013). En los próximos años se espera un aumento de la incidencia de la hipertensión, así como de las ECV derivadas (Hanson y col., 2014), de ahí el interés de las políticas gubernamentales por diseñar estrategias para la prevención y el control de la hipertensión, con el fin de reducir la carga económica que supone ésta y otras patologías asociadas para el sistema sanitario.



**Figura 1: Costes totales derivados de las ECV, enfermedad coronaria y enfermedad cerebrovascular en 2009 en la UE (Nichols y col., 2012).**

Según las estadísticas europeas (Nichols y col., 2012), el coste global derivado de las ECV es de aproximadamente 196 billones de euros al año del cual el 54% se atribuye a los costes sanitarios directos, el 24% a la pérdida de productividad y el 22% al cuidado de los pacientes afectados (Figura 1). Además, aproximadamente el 19% de los costes debidos a las ECV se atribuyen a las enfermedades coronarias y el 18% a las enfermedades cerebrovasculares. En España, los costes por ECV ascendieron a 1,4 millones de euros por la pérdida de productividad por mortalidad y de 940 mil euros por morbilidad.

## **2.2 Patogénesis y tratamiento de la hipertensión**

La función más importante de la presión sanguínea es forzar la adecuada provisión de la sangre a través del sistema vascular a los tejidos. La regulación de la presión sanguínea es una función fisiológica compleja llevada a cabo por la acción integrada de los sistemas cardiovascular, renal, nervioso y endocrino (Hall y col., 2012). Por este motivo, la hipertensión arterial es una patología multifactorial en cuya patogénesis están implicados diversos mecanismos moleculares y sistemas metabólicos. Entre ellos destacan:

**A) Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA).** El SRAA es el sistema mejor conocido entre los que regulan la presión sanguínea. Este complejo sistema neuroendocrino protege al corazón, endotelio vascular, cerebro y riñón de una exposición sostenida a una presión sanguínea por encima de los valores fisiológicos. La activación del SRAA incrementa la presión sanguínea, fenómeno que produce un daño mecánico en el endotelio vascular, estimulando una respuesta inflamatoria local para reparar ese daño. La activación crónica de este sistema conduce a la hipertensión e induce una cascada de fenómenos proinflamatorios, protrombóticos y aterogénicos que dañan el endotelio vascular (Weir, 2007). El SRAA se activa cuando la renina, aspartil proteasa sintetizada en las células yuxtaglomerulares del riñón, es liberada al torrente circulatorio en respuesta a una disminución del flujo sanguíneo en el riñón. La renina escinde el angiotensinógeno, sintetizado en el hígado, dando lugar al decapeptido angiotensina I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu), que no tiene actividad biológica. La enzima convertidora de angiotensina I (ECA) cataliza la hidrólisis de la angiotensina I al octapéptido angiotensina II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), que es biológicamente activo (Pacurari y col., 2014).

La angiotensina II se une a dos subclases de receptores específicos de membrana (AT1 y AT2). La mayor parte de los efectos fisiológicos de la angiotensina II están mediados por la activación de los receptores AT1 que produce, entre otras acciones, vasoconstricción, activación del sistema nervioso simpático a nivel central y periférico, y estimulación de la síntesis y liberación de aldosterona, con la consecuente retención de sodio y agua por el riñón que incrementa el volumen de fluido extracelular (Chen y col., 2009). Todas estas acciones conducen a la elevación de la presión sanguínea. La activación de los receptores AT1 estimula, además, la actividad de las NADH y NADPH oxidasas, que inducen la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO) en el tejido vascular (Griendling y col., 1994), la estimulación de la liberación del factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) y de otros factores de crecimiento y citoquinas, así como la oxidación del colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL). Estas acciones contribuyen a la inducción de fenómenos inflamatorios y aterogénicos en el endotelio vascular (Weir, 2007).

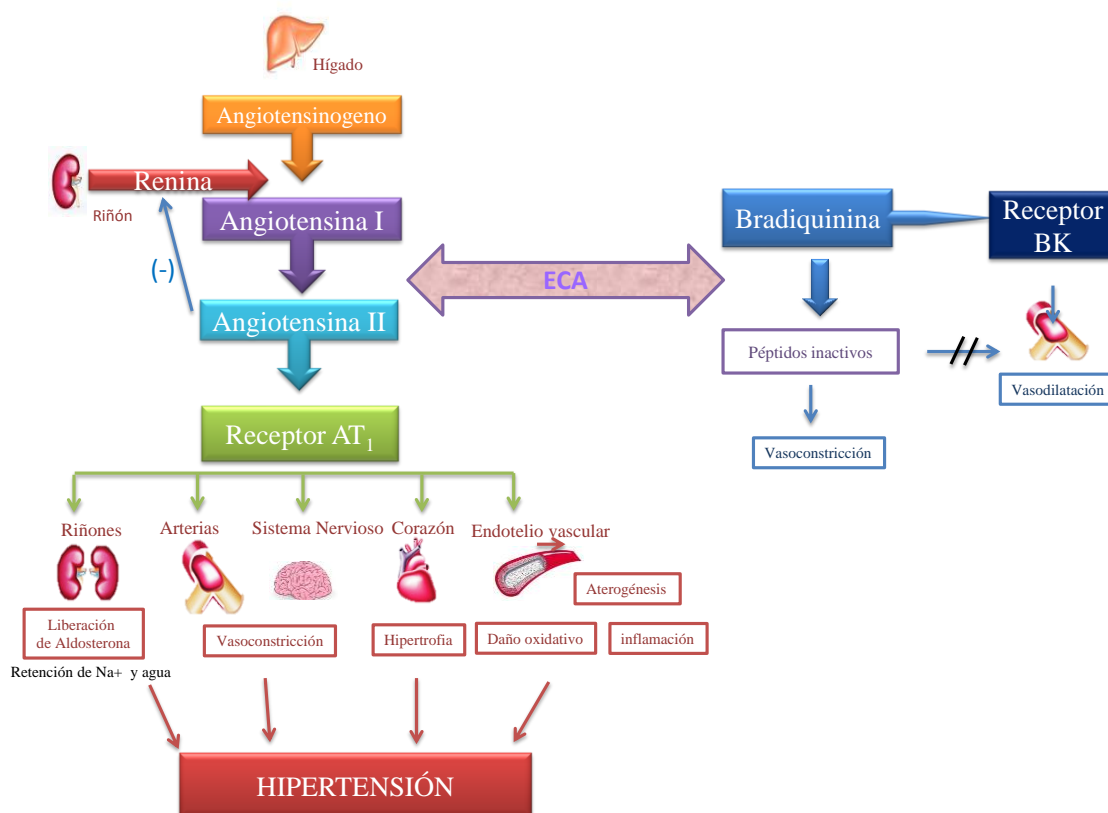


Figura 2: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA).

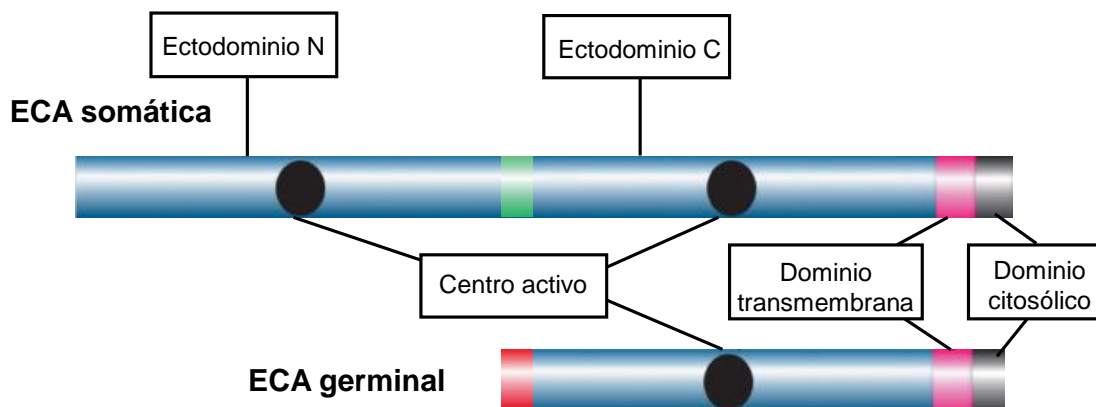


Los receptores AT1 están ampliamente distribuidos en tejidos y órganos como los vasos sanguíneos, el corazón, las glándulas suprarrenales, el hígado, el cerebro y los pulmones (Ferrario, 2006). Los receptores AT2 tienen acciones reguladoras antagonistas a las realizadas por los receptores AT1, como vasodilatación, inhibición del crecimiento celular, reparación de tejidos y apoptosis. La expresión de los receptores AT2, muy elevada en la etapa fetal, disminuye tras el nacimiento, motivo por el cual en el individuo adulto predominan las acciones mediadas por la activación del receptor AT1 (Zaman y col., 2002; Ferrario, 2006) (Figura 2).

En condiciones fisiológicas, niveles elevados de angiotensina II inhiben la liberación de renina para normalizar la presión sanguínea. Sin embargo, en algunas formas de hipertensión este mecanismo de control no funciona correctamente, produciéndose una sobreexpresión de renina que conduce a una elevación continuada de la presión sanguínea (Zaman y col., 2002) (Figura 2).

Adicionalmente, la ECA también cataliza la hidrólisis de la bradiquinina, nonapéptido vasodilatador, dando lugar a péptidos inactivos, acción que conduce a una vasoconstricción y, consecuentemente, a la elevación de la presión sanguínea (Chen y col., 2009) (Figura 2).

La ECA (EC 3.4.15.1) es una metalopeptidasa dependiente de zinc con un peso molecular de 150-180 kDa. Existen dos isoformas de ECA en humanos: la somática, que se expresa en células endoteliales y epiteliales, por lo que está presente de forma ubicua en el organismo, y la germinal, presente exclusivamente en las células testiculares (Guang y Philips, 2009). Ambas isoformas presentan un dominio hidrofílico C-terminal citoplasmático, un dominio transmembrana que ancla la enzima a la membrana y un ectodominio N-terminal. En la isoforma somática, el ectodominio se divide, a su vez, en dos dominios homólogos (dominio N y dominio C), cada uno de los cuales contiene un centro activo con alta homología entre ellos pero con distintas constantes catalíticas (Peters, 1995) (Figura 3). El zinc se une a los centros catalíticos y actúa como cofactor. La ECA actúa como una enzima exopeptidasa, hidrolizando dipéptidos del extremo C-terminal libre de la angiotensina I y de la bradiquinina (Guang y Philips, 2009). Algunos estudios demuestran que el dominio C de la ECA somática es el implicado en la regulación de la presión sanguínea (Ni y col., 2012).



**Figura 3: Organización estructural de la ECA somática y germinal (Fuente: Ehlers y col., 2012, modificada).**

Dado el papel central que juega la ECA en la regulación de la presión sanguínea, el empleo de inhibidores de esta enzima es una de las estrategias terapéuticas utilizadas en el control de la hipertensión. Inhibidores sintéticos de la ECA han sido, de hecho, los primeros en emplearse para el tratamiento farmacológico de esta patología (Iwaniak y col., 2014). Los inhibidores de la ECA bloquean la hidrólisis de angiotensina I a angiotensina II e incrementan la disponibilidad de bradiquinina. En la actualidad, existe una amplia variedad de fármacos sintéticos inhibidores de la ECA indicados en el tratamiento de la hipertensión: benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, zestril, moexipril, perindopril, quinapril, accupril, ramipril y trandolapril (Sweitzer 2003), que comparten un residuo estructural común que interacciona con el zinc del centro activo de la enzima (Ferrario, 2006). A pesar de que estos fármacos han demostrado una gran eficacia en la disminución de la presión sanguínea, su administración ocasiona efectos secundarios adversos. Entre ellos destacan la tos seca que afecta al 5-20% de los pacientes, y el angioedema que afecta al 0,1-0,5% de los individuos (Acharya y col., 2003; Riordan, 2003), aunque también han sido descritos efectos fetotóxicos, anuria, hipocalvaria, displasia renal, fallo renal, malformaciones congénitas e, incluso, la muerte (Pryde y col., 1993; Cooper y col., 2006).

La posibilidad de emplear la dieta como fuente de compuestos que inhiban la ECA es una alternativa natural, más segura y económica al uso de fármacos para la prevención y control de la hipertensión.

**B) Estrés oxidativo.** El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre las ERO y los mecanismos de defensa antioxidantes del organismo. Está ampliamente documentado que el estrés oxidativo contribuye a la etiología de la hipertensión (Kitiyakara, y Wilcox, 1998; Taniyama y Griendling, 2003; Kizhakekuttu y Widlansky, 2010; Mansego y col., 2011). Las ERO se generan en condiciones fisiológicas como consecuencia del metabolismo celular por activación de diversas enzimas como la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) desacoplada, la xantina oxidoreductasa, enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial y la NADPH (Adlam y col., 2007; Nishino y col., 2008; Sedeek y col., 2009). En condiciones fisiológicas, las ERO regulan procesos celulares como la diferenciación, proliferación y apoptosis celular, el ciclo celular, la migración celular y organización del citoesqueleto y la expresión génica. En el sistema vascular, las ERO controlan la función endotelial y el tono muscular (Montezano y Touyz, 2014). Sin embargo, la formación incontrolada de ERO o una disminución de los mecanismos de defensa antioxidantes conducen al estrés oxidativo.

El papel del estrés oxidativo en la hipertensión es complejo ya que puede ser la causa, la consecuencia o un factor potenciador de esta patología (Araujo y Wilcox, 2014). No se conocen todos los mecanismos por los que el estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de la hipertensión, pero está ampliamente documentada la mediación de niveles elevados de ERO en varios sistemas y órganos como el cerebro, el corazón, los riñones y los vasos sanguíneos en el desarrollo de la hipertensión. A nivel del endotelio vascular, las ERO reaccionan con el óxido nítrico (ON) endotelial, molécula vasodilatadora producida por la eNOS y conducen a la formación de peroxinitrito, una potente molécula oxidante. La disminución de la biodisponibilidad de ON produce contracción de los vasos sanguíneos (Harrison y col., 2007). Además, el peroxinitrito oxida la tetrahidrobiopterina, cofactor de la eNOS, fenómeno que causa una disminución de la síntesis de ON y un aumento de la producción del ión superóxido (estado conocido como desacoplamiento de la eNOS) (Stuehr y col., 2001). La disminución de la síntesis y biodisponibilidad del ON y el incremento en la concentración de ERO contribuyen a la patogénesis de la hipertensión.

Además, el estrés oxidativo en el endotelio vascular desencadena una cascada proinflamatoria, ya que las ERO activan el factor de transcripción nuclear  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) en

las células endoteliales y aumenta la expresión de las quimioquinas en el músculo vascular liso, conduciendo al reclutamiento de células inflamatorias (monocitos y macrófagos) dentro de los vasos sanguíneos y a la producción de citoquinas (Crowley, 2014). La activación del factor  $\text{NF-}\kappa\beta$  estimula, además, la expresión del angiotensinógeno (Li y Brasier, 1996) activándose, por tanto, el SRAA. Adicionalmente, el estrés oxidativo incrementa la permeabilidad del endotelio vascular, facilitando la penetración de neoantígenos proinflamatorios en los vasos sanguíneos, que son responsables de la activación de la respuesta inmune adaptativa e innata (Sima y col., 2009). Estos neoantígenos son moléculas endógenas del organismo que pueden oxidarse fácilmente, de modo que el organismo no las reconoce como propias. En este sentido, existen evidencias científicas que demuestran que la expresión de la proteína de shock térmico 70 (HSP70) está incrementada en los riñones y linfocitos de individuos con hipertensión (Parra y col., 2008; Pons y col., 2013). Esta proteína juega un papel muy importante en el desarrollo de la hipertensión porque induce la transformación de los linfocitos T en neoantígenos (Wendling y col., 2000) desencadenando una respuesta proinflamatoria cuando penetran a través del endotelio vascular.

La implicación del estrés oxidativo en el desarrollo de la hipertensión sugiere que el consumo de sustancias antioxidantes podría contribuir a la prevención y control de esta patología.

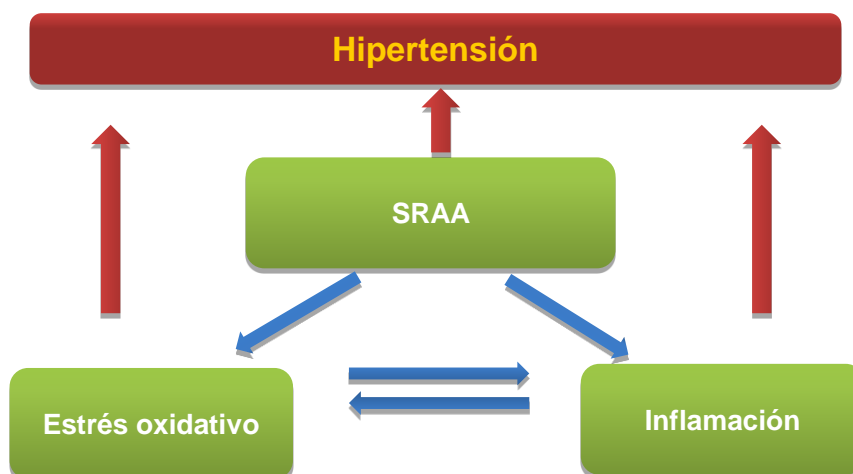
**C) Inflamación.** La implicación de los fenómenos inflamatorios en el desarrollo de la hipertensión ha sido ampliamente demostrada. En modelos animales de hipertensión se ha descrito la infiltración de células del sistema inmune innato, como macrófagos y monocitos, en los vasos sanguíneos. Ambos tipos de células expresan receptores para la angiotensina II y receptores mineralocorticoides que conducen a la generación de ERO por activación de la NADPH oxidasa (Virdis y col., 2014). El incremento de ERO en los vasos sanguíneos ocasiona una disminución de la biodisponibilidad del ON, como se ha explicado anteriormente. Los macrófagos y monocitos, además, activan células dendríticas que se acumulan junto con las células “natural killer” en la pared de los vasos sanguíneos, en el riñón y en el corazón y favorecen la activación de linfocitos B y T (Schiffrin, 2014). Los macrófagos, además, estimulan la liberación de citoquinas proinflamatorias, como el interferón-gamma ( $\text{IFN-}\gamma$ ) por parte de las células “natural killer”.

La activación de linfocitos T en el riñón promueve, a su vez, la entrada de otras células proinflamatorias como los macrófagos, ocasionando una vasoconstricción renal y un incremento de la reabsorción de sodio, potenciándose la severidad de la hipertensión (Harrison y col., 2011). Los linfocitos T, a su vez, liberan el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), el IFN- $\gamma$  y las interleuquinas IL-6 y IL-17, que favorecen la lesión del endotelio vascular.

El estrés oxidativo ocasiona, además, un aumento de la expresión de moléculas de adhesión celular (molécula de citoadhesión vascular-1, VCAM-1 y molécula de adhesión intercelular-1, ICAM-I) por parte del endotelio vascular. El aumento en la expresión de estas moléculas produce la adhesión de los leucocitos circulantes al endotelio vascular y su posterior extravasación. Este hecho, a su vez, lleva consigo la expresión de citoquinas, desencadenándose una cascada inflamatoria que daña el endotelio vascular (Schiffrin, 2014), fenómeno que contribuye a la patología de la hipertensión. El daño del endotelio vascular así como los niveles de IL-6 elevados provocan, además, un aumento en la síntesis de la proteína C reactiva (PCR) por parte del hígado, incrementándose con ello sus niveles plasmáticos (Schillaci y Pirro, 2006; Vongpatanasin y col., 2014). El aumento en la concentración en plasma de la PCR reduce la producción de ON endotelial y estimula la liberación de endotelina-1, agente vasoconstrictor, favoreciéndose la disminución de la relajación del endotelio vascular, fenómeno implicado en el desarrollo de la hipertensión. Adicionalmente, la PCR incrementa la expresión de moléculas de adhesión celular y el reclutamiento de monocitos en el endotelio (Schillaci y Pirro, 2006).

La inflamación del endotelio vascular induce, también, la síntesis de ciclooxigenasa 2 (COX-2) (Félétou y col., 2011), enzima que cataliza la síntesis de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) a partir de ácido araquidónico. La activación de esta enzima provoca la generación del radical superóxido en el endotelio vascular, radical también implicado en la reducción en los niveles de ON (Virdis y col., 2014) y, en consecuencia, en la patogénesis de la hipertensión.

Teniendo en cuenta la información expuesta, se puede deducir la elevada complejidad de los distintos mecanismos fisio-patológicos implicados en el desarrollo de la hipertensión, interrelacionados todos ellos entre sí (Figura 4).



**Figura 4:** Interconexión del SRAA, el estrés oxidativo y la inflamación y su implicación en la patogénesis de la hipertensión.

Hasta este momento, no se han descrito fármacos de amplio espectro que actúen sobre distintas dianas moleculares implicadas en la hipertensión. Generalmente, se emplean fármacos que actúan sobre un solo mecanismo. Estos fármacos ocasionan efectos secundarios, como se ha indicado anteriormente, y son ineficaces en pacientes con hipertensión “resistente”. La prevención de la hipertensión a través de la dieta se presenta como una alternativa natural y segura al tratamiento farmacológico. En este sentido, el consumo de alimentos funcionales que actúen a nivel de varios de los mecanismos implicados en la hipertensión constituye una estrategia novedosa y valiosa para el control de esta patología.

## **2.3 Aproximaciones dietéticas en la prevención y control de la hipertensión**

Entre las estrategias de prevención desarrolladas para combatir la hipertensión, las modificaciones dietéticas han ganado una mayor popularidad con el paso de los años, siendo una opción factible incluso desde la infancia. No existe una única aproximación dietética para la prevención y tratamiento de la hipertensión arterial, por tanto, las agencias internacionales intentan diversificar las recomendaciones.

La sensibilidad a la sal (aumento  $\geq 10\%$  en la presión arterial media con el consumo de sal) ocurre en aproximadamente un 51% de los pacientes hipertensos. Por

tanto, la disminución de la ingesta de cloruro de sodio en la dieta es una de las primeras recomendaciones dietéticas que ha demostrado su utilidad en la reducción de la presión arterial en pacientes sensibles a la sal. Esta recomendación puede conseguir disminuciones de los niveles de tensión sistólica y diastólica de 2,5 y 3,9 mm Hg, respectivamente, las cuales están asociadas con reducciones en la eliminación de sodio de 50 a 100 mmoles/día en orina (Capuccio y col., 2006; Cook y col., 2007). Hasta el momento, la OMS recomienda una ingesta máxima de sal diaria de 5 g con el objeto de prevenir la hipertensión arterial (NAOS, 2009).

Las dietas hipocalóricas también han demostrado ser una opción terapéutica en el control de la hipertensión, teniendo en cuenta que un elevado porcentaje de pacientes hipertensos son obesos. Las dietas que conducen a pérdidas de peso que oscilan entre un 5-10 % del peso inicial pueden disminuir los niveles de presión arterial sistólica y diastólica 6,3 y 4,3 mm Hg, respectivamente (Horvath y col., 2008). Dentro de las posibles modificaciones en la distribución de macronutrientes que se pueden realizar para prescribir una dieta hipocalórica, una de las más evaluadas es la disminución de las grasas saturadas y el incremento de las grasas poliinsaturadas. La reducción del consumo de grasas saturadas y el mayor consumo de ácidos grasos poliinsaturados ( $\omega 3$  y  $\omega 6$ ) o monoinsaturados (ácido oleico) se asocia a un descenso en los niveles de presión sanguínea (de Luis Román y col., 2008).

El abordaje dietético más complejo e interesante realizado hasta el momento corresponde al estudio denominado DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension) (Appel y col., 1997). En este estudio se demostró que los niveles de presión arterial disminuían con una dieta rica en frutas, vegetales, leguminosas y lácteos (desnatados o semidesnatados). Desde el punto de vista nutricional, esta dieta es rica en proteínas vegetales, fibra, potasio, magnesio, calcio y baja en grasa total, grasa saturada y colesterol. Comparado con una dieta control, esta dieta redujo 5,5 y 3,0 mm Hg de media la presión arterial sistólica y diastólica, respectivamente, después de 8 semanas, tanto en individuos hipertensos como en normotensos. En un segundo trabajo, los mismos investigadores realizaron un diseño basado en DASH donde además se disminuyó el aporte de sodio para analizar el efecto adicional que se producía en los niveles de presión arterial (Vollmer y col., 2001). Los resultados de este trabajo demostraron que la

reducción de sodio con las recomendaciones dietéticas del estudio DASH disminuye la presión arterial sistólica 7,1 mm Hg en normotensos y 11,5 mm Hg en hipertensos. Más recientemente, Lima y col. (2013) observaron que los efectos saludables de las recomendaciones del estudio DASH con bajo aporte de sodio pueden mejorarse si, además, la dieta tiene un bajo índice glicémico. Otro estudio reciente sugiere que la dieta DASH puede ser considerada como tratamiento modelo también en adolescentes al haberse demostrado que reduce la prevalencia de la hipertensión y de otros componentes del síndrome metabólico (Saneei y col., 2013).

Patrones dietéticos como la Dieta Mediterránea están asociados a niveles más bajos de presión sanguínea, como se ha puesto de manifiesto en numerosos estudios epidemiológicos y clínicos (Martínez-González y col., 2009; Domenech y col., 2014). La Dieta Mediterránea se caracteriza por un alto consumo de frutas, verduras, leguminosas, frutos secos y aceite de oliva. Otras características adicionales de esta dieta incluye el consumo de pescado y pollo en cantidades de moderadas a bajas, carnes rojas en bajas cantidades y un consumo moderado de vino tinto. Diferentes estudios indican que los beneficios saludables de la Dieta Mediterránea se deben, principalmente, a la interacción de los diferentes constituyentes de los alimentos más que a un solo grupo de alimentos (Grosso y col., 2014).

A pesar del alto nivel de conocimientos existentes, la tendencia dietética de la población general se aleja de las recomendaciones nutricionales o patrones dietéticos como la Dieta Mediterránea, siendo necesarios esfuerzos adicionales que contribuyan a la prevención de la hipertensión. Como se ha expuesto anteriormente, la patogénesis de la hipertensión es multifactorial y, por lo tanto, es de gran importancia tener en cuenta el aporte de compuestos bioactivos multifuncionales en el desarrollo de nuevas estrategias dietéticas.

Estudios recientes han comprobado que una dieta que combine diferentes componentes con actividad antiinflamatoria, antioxidante, antihipertensiva y prebiótica es capaz de reducir notablemente no sólo la presión arterial sino también otros biomarcadores de riesgo cardiometabólico en voluntarios sanos (Sirtori y col., 2009; Tovar y col., 2012). La adherencia a una dieta como hábito en el estilo de vida de la población es, a menudo complicada. Por tanto, otra alternativa al diseño de recomendaciones



dietéticas que ha suscitado un gran interés, es el desarrollo de nuevos alimentos multifuncionales que aporten beneficios saludables con base científica y puedan ser incorporados a los patrones alimentarios habituales de los consumidores (Hu, 2011).

## **2.4 Las leguminosas y su papel en el control de la hipertensión**

Las leguminosas son uno de los alimentos clave dentro de la Dieta Mediterránea. Numerosos estudios epidemiológicos sustentan una relación beneficiosa entre el consumo de leguminosas y la presión arterial (Sacks y col., 2001; Elliot y col., 2006). El efecto positivo de las leguminosas en la presión arterial también se ha confirmado en numerosos estudios clínicos (Tabla 1).

En dietas con restricción calórica se ha demostrado que el consumo de leguminosas reduce significativamente la presión sanguínea en individuos hipertensos y normotensos (Abete y col., 2009; Lee y col., 2009; Belski y col., 2011; Hermsdorff y col., 2011). Recientemente, un meta-análisis determinó que la sustitución isocalórica de ciertos alimentos por leguminosas reduce significativamente la presión sistólica y diastólica, así como la presión arterial media en individuos hipertensos y normotensos (Jayalath y col., 2014).

No todas las leguminosas tienen la misma efectividad para atenuar la hipertensión. Un estudio de 2014 concluye que leguminosas como la judía, el guisante, la lenteja y el garbanzo reducen de forma similar algunos biomarcadores de riesgo cardiometabólico (colesterol total y colesterol-LDL) y sólo las lentejas reducen significativamente la presión arterial y el remodelado arterial en ratas espontáneamente hipertensas (Hanson y col., 2014).

Con estas evidencias científicas, numerosas asociaciones y organismos internacionales que destinan sus esfuerzos a la prevención y tratamiento de la hipertensión recomiendan el aumento del consumo de leguminosas.

**Tabla 1: Ensayos clínicos que muestran el efecto del intercambio isocalórico de leguminosas en la presión sistólica (PS), diastólica (PD) y presión arterial media (PAM).**

Sujetos	Seguimiento	Dosis (g/día)	Tipo de leguminosa	Tipo de estudio	Diferencia media en mm Hg (intervalo de confianza 95%)			Referencias
					PS	PD	PAM	
18 OB	8 semanas	113	Lentejas, garbanzos, guisantes, judías	Paralelo	-8.90 (-14.04, -3.73)	-2.60 (-8.70, 3.50)	-2.70 (-3.97, -1.43)	Abete y col. (2009)
82 N	8 semanas	250	Lentejas, garbanzos, guisantes, judías	Cruzado	2.00 (-1.00, 5.00)	1.00 (-1.00, 3.00)	1.00 (0.84, 1.16)	Abeysekara y col. (2012)
131 SP/OB	1 año	123	Altramuz	Paralelo	-1.30 (-2.36, -0.24)	-1.00 (-1.84, -0.16)	-0.80 (-0.96, -0.64)	Belski y col. (2011)
132 SPM	16 semanas	81	Lentejas, garbanzos, guisantes, judías	Paralelo	1.60 (-1.75, 4.95)	0.18 (-2.23, 2.59)	-3.40 (-4.26, -2.54)	Gravel y col. (2010)
30 OB	8 semanas	113	Lentejas, garbanzos, guisantes, judías	Paralelo	-6.10 (-11.67, -0.53)	-2.00 (-3.84, -0.16)	-0.60 (-0.84, -0.36)	Hermisdorff y col. (2011)
121 DM2	12 semanas	211	Lentejas, garbanzos, guisantes, judías	Paralelo	-4.50 (-7.01, -1.99)	-3.10 (-4.81, -1.39)	-0.60 (-0.84, -0.36)	Jenkins y col. (2012)
74 SP/OB	16 semanas	132	Altramuz	Paralelo	-3.00 (-5.57, -0.43)	0.60 (-1.01, 2.21)	-0.20 (-0.87, 0.47)	Lee y col. (2009)
26 N	29 días	275	Lentejas, garbanzos, guisantes, judías	Cruzado	-1.60 (-6.19, 2.99)	0.39 (-1.90, 2.68)	-0.75 (-1.44, -0.06)	Veenstra y col. (2010)
554	--	--	--	Meta-análisis	-2.25 (-4.22, -0.28)	-0.71 (-1.74, 0.31)	-0.75 (-1.44, -0.06)	Jayalath y col. (2014)

OB, obeso; N, normal; SP, sobrepeso; SPM, síndrome pre-metabólico; DM2, diabetes mellitus tipo 2.

## **2.5 Las leguminosas como fuente de compuestos antihipertensivos**

Las leguminosas presentan compuestos bioactivos a los que se les atribuye un efecto beneficioso sobre la presión sanguínea. Las leguminosas son fuente de proteína y polifenoles que parecen ser los responsables de los efectos antioxidantes, antiinflamatorios, inhibidores de la ECA y vasodilatadores (Azadbakht y col., 2007; Sites y col., 2007; Kitano-Okada y col., 2012; Boschini y col., 2014; Burris y col., 2014). Durante el procesamiento de leguminosas puede producirse la liberación de péptidos bioactivos, la transformación de compuestos fenólicos o la síntesis de nuevos compuestos como el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) que pueden aportar beneficios adicionales en la reducción de la hipertensión.

### **2.5.1 Proteínas**

Las leguminosas son una excelente fuente de proteína vegetal (20-40% de su peso seco) (Duranti, 2006). La mayoría de las proteínas de leguminosas son proteínas de almacenamiento que se clasifican en globulinas, albúminas, prolaminas y glutelinas en base a sus propiedades de solubilidad. Las globulinas son solubles en soluciones salinas representando aproximadamente el 70% del total de proteínas en la semilla. Las globulinas, a su vez, se clasifican en 7S y 11S de acuerdo a su coeficiente de sedimentación (S). Las globulinas 7S y 11S de guisante se conocen como vicilina y legumina, respectivamente, así que es común denominar a las globulinas de otras leguminosas como globulinas tipo vicilina y legumina. Las globulinas 7S y 11S son oligoméricas formando trímeros con masas moleculares de 175.000-180.000 Da y hexámeros con subunidades ácidas (~ 40.000 Da) y básicas (~ 20.000 Da), respectivamente (Duranti y Gius, 1997). Las globulinas tipo legumina de soja pueden formar agregados más grandes de coeficiente de sedimentación mayor (15S–18S) (Koshiyama, 1983). Un tercer tipo de las proteínas de almacenamiento, distinto de las leguminas y vicilinas, se purificó por primera vez de las semillas de guisante y se denominó “convicilina” (Croy y col., 1980). Esta proteína tiene un perfil de aminoácidos distintivo y, a diferencia de la vicilina, está menos glicosilada y en forma nativa está constituida por diferentes subunidades de 71.000 Da que dan lugar a una masa molecular

de 290.000 Da. Las convicilinas se encuentran en otras especies de leguminosas de los géneros *Lathyrus*, *Lens*, *Pisum* y *Vicia* y el tamaño de la extensión N-terminal difiere entre diferentes especies (Sáenz de Miera y col., 2008). Desde el punto de vista nutricional, todas las proteínas de almacenamiento tienen un contenido relativamente bajo de los aminoácidos azufrados metionina, cisteína y de triptófano, pero la concentración de otros aminoácidos esenciales como la lisina es mucho mayor que la de los cereales (Rockland y Radke, 1981; Ampe y col., 1986).

Las albúminas son solubles en agua y engloban a proteínas enzimáticas, inhibidores de proteasas, inhibidores de amilasas y lectinas, todas ellas con masas moleculares de entre 5.000 y 80.000 Da. Las proteínas minoritarias de las leguminosas incluyen las prolaminas y glutelinas (Gupta y Dhillon, 1993; Saharan y Khetarpaul, 1994). Las prolaminas son solubles en soluciones alcohólicas y se caracterizan por tener una elevada proporción de prolina y glutamina. Por otro lado, las glutelinas son solubles en soluciones diluidas de detergentes ácidos o alcalinos y en presencia de agentes reductores o caotrópicos (Osborne, 1924). Las glutelinas contienen una mayor concentración de metionina y cistina que las globulinas y, por tanto, también son interesantes desde el punto de vista nutricional.

Estudios observacionales muestran una fuerte asociación entre la ingesta de proteína de leguminosas y la reducción de la presión sanguínea (Altorf-van der Kuil y col., 2010). Estas evidencias científicas se encuentran apoyadas por estudios clínicos aleatorizados y controlados en los que se ha observado que la ingesta de proteínas de leguminosas a expensas de los carbohidratos de forma isocalórica reduce la presión arterial en individuos obesos con pre-hipertensión e hipertensión grado 1 (Teunissen-Beekman y col., 2012).

Los mecanismos que subyacen al efecto beneficioso de la proteína de leguminosas en la presión arterial aún no están claros. Algunas hipótesis sugieren que la ingesta de proteína está relacionada con la síntesis celular de canales iónicos que podrían tener una influencia indirecta en las rutas de regulación de la presión sanguínea (Stamler y col., 1996). Una elevada ingesta de proteína puede inducir natriuresis ocasionando una bajada de la presión sanguínea (He y col., 2005). Además de estas hipótesis, algunos estudios demuestran que las proteínas de soja aumentan la expresión del receptor de la insulina

reduciendo la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia, ambos fenómenos descritos como mecanismos patogénicos de la hipertensión secundaria (Iritani y col., 1997; Ruggenti y col., 2009). La suplementación de proteína en la dieta puede resultar en una mayor concentración de los aminoácidos tirosina y triptófano en regiones del cerebro o de la pared de los vasos sanguíneos provocando una respuesta vasodilatadora (Anderson, 1986). A su vez, el aminoácido arginina juega un papel muy importante en la vasodilatación porque se utiliza como sustrato en la síntesis de ON. Así, la actividad vasodilatadora observada en modelos animales de hipertensión tras el consumo de proteína de altramuz se relaciona con su alto contenido en arginina (Pilvi y col., 2006).

Estudios *in vivo* sugieren que la proteína de soja puede prevenir o atenuar el desarrollo de ECV mediante su actividad antioxidante (Manzoni y col., 2003) y antiinflamatoria (Burris y col., 2014). La globulina 7S de soja interacciona con la tioredoxina 1 y la ciclofilina B, dos componentes celulares que están implicados en la protección del organismo al estrés oxidativo (Manzoni y col., 2003). Más recientemente, se ha demostrado que la proteína de soja puede inhibir la respuesta inflamatoria dependiente del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Burris y col., 2014).

### **2.5.2 Péptidos bioactivos**

Los péptidos bioactivos se definen como secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis química o enzimática (Möller y col., 2008). Generalmente, son péptidos de pequeño tamaño, de 2 a 20 aminoácidos (aunque en algunas ocasiones pueden exceder esta longitud), que son liberados durante el procesado industrial de los alimentos o bien durante la digestión gastrointestinal (Erdmann y col., 2008). Tras su administración oral, los péptidos bioactivos pueden ejercer su efecto sobre los sistemas cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso. La literatura científica evidencia que estos péptidos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos a través de la circulación, pudiendo ejercer funciones específicas a nivel local, en el tracto gastrointestinal y a nivel sistémico (Hernández-Ledesma y col., 2011). Los péptidos bioactivos pueden influir en el metabolismo celular y

actuar como vasoreguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores (Möller y col., 2008).

Se han identificado un gran número de péptidos bioactivos procedentes mayoritariamente de las leguminas, vicilinas y convicilinas como los responsables de la actividad antihipertensiva observada en hidrolizados proteicos o productos fermentados derivados de leguminosas (Tabla 2). Muchos de los péptidos descritos hasta ahora han demostrado actividad inhibidora de la ECA capaz de regular el SRAA y provocar la reducción de la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (Shin y col., 2001; Rhyu y col., 2002). Varios estudios han identificado diversas características estructurales que influyen en la potencia inhibidora de la ECA de péptidos derivados de proteínas alimentarias (Tan y col., 2013; Iwaniak y col., 2014). La mayoría de los péptidos inhibidores de la ECA son secuencias relativamente cortas entre 2 y 12 aminoácidos. Los tres últimos aminoácidos del extremo C-terminal juegan un papel predominante en la unión competitiva al centro activo de la enzima. Se ha descrito que la ECA prefiere sustratos o inhibidores que contienen aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos o de cadenas laterales ramificadas) en cada una de las tres últimas posiciones del extremo C-terminal.

La hidrólisis de las proteínas de leguminosas durante el procesado o la digestión gastrointestinal también puede dar lugar a la liberación de péptidos antioxidantes (Tabla 2). La actividad antioxidante de péptidos derivados de leguminosas se ha demostrado *in vitro* e incluye varios mecanismos como la adsorción de iones metálicos y la neutralización de radicales libres mediante donación de electrones o protones (Darmawan y col., 2010; Carrasco-Castilla y col., 2012; Medina-Godoy y col., 2012; Garcia-Mora y col., 2014, 2015). Existe una relación directa entre la estructura de los péptidos y su actividad antioxidante y se ha demostrado que secuencias ricas en histidinas y aminoácidos hidrofóbicos confieren actividad antioxidante (Elias y col., 2008).

En el caso de emulsiones alimentarias y liposomas, los péptidos pueden actuar como barrera física alrededor de las gotas de grasa evitando su oxidación. De acuerdo con Kong y Xiong (2006), los péptidos pequeños pueden difundirse a la interfase agua-aceite del liposoma quedando adsorbidos o débilmente unidos a los fosfolípidos de la membrana, zona donde normalmente tiene lugar la oxidación.

Tabla 2: Bioactividad de péptidos derivados de proteínas de leguminosas por hidrólisis enzimática o fermentación.

Hidrolizados proteicos				
Leguminosa	Enzima	Péptido (IC <sub>50</sub> )	Bioactividad	Referencias
Altramuz blanco	Pepsina	(0,14 mg/mL)	Inhibición de la ECA	Boschiny col. (2014)
Judía caupí	Flavourzyme	(31 µg/mL)	Inhibición de la ECA Antioxidante	Segura-Campos y col. (2010)
Garbanzo	Alcalasa	(0,103-0,108 mg/mL)	Inhibición de la ECA	Pedroche y col. (2002)
		MD (0,02 mg/mL)		
		MDLI (0,01 mg/mL)		
		MDLI (0,01 mg/mL)		
		MDLA (0,01 mg/mL)		
Guisante	Pepsina Alcalasa y flavourzyme	No determinado	Antioxidante	Yust y col. (2003)
		(0,045 µg/mL)		
		No determinado		
		RQSHFANAQP		
		(< 0,16 mg/mL)		
Judía adzuki	Termolisina α-amilasa, pepsina y pancreatina	NRVHE	Reduce la presión sanguínea en ratas hipertensas	Vermeirssen y col. (2005)
		Prolaminas:		
		(0,17 mg/mL / 0,06 mg/mL)		
Judía mungo	Alcalasa	KDYRL (26,5 µM)	Inhibición de la ECA Reduce la presión sanguínea en ratas hipertensas	Liy col. (2006a,b)
		VTPALR (82,4 µM)		
		KLPAGTLF (13,4 µM)		
Judía jamapa y judía lima	Alcalasa y flavourzyme	Jamapa (0,06-0,13 mg/mL)	Inhibición de la ECA	Torruco-Uco y col. (2009)
		Lima (0,06-0,007 mg/mL)		
Judía común	Proteasas aisladas de <i>Zea mays</i> y <i>Opuntia tuna</i> Tripsina (T); Digestión gastrointestinal (DG) Pepsina y pancreatina	No determinado	Reduce la presión sanguínea en ratas hipertensas	Nazif y El-Sayed (2008)
		HT (0,17 mg/mL)		
		DG (0,12 mg/mL)		
Judía amarga	Alcalasa	< 1kDa	Antioxidante	Carrasco-Castilla y col. (2012)
		Secuencias peptídicas < 10kDa		
Lenteja	Proteasas aisladas de <i>Zea mays</i> y <i>Opuntia tuna</i> Savinasa	No determinado	Reduce la presión sanguínea en ratas hipertensas	Nazif y El-Sayed (2008)
		(0,18 mg/mL)		
			Inhibición de la ECA Antioxidante	García-Mora y col. (2014)

Hidrolizados proteicos			
Leguminosa	Enzima	Péptido (IC <sub>50</sub> )	Bioactividad
Soja	Pepsina	YLAGNQ (14 µM) FEL (37 µM) IYLL (42 µM) VMDKPGG (39 µM) IA (153 µM)	Inhibición de la ECA
	Pepsina y pancreatina	(0,21 mg/mL) (0,93 mg/mL)	
		LLPHH	Antioxidante
	Proteasa S	VAP VKP VTP	Inhibición de la ECA Reduce presión sanguínea en ratas hipertensas
	Proteasa P	VLVP (1,69 µM)	Inhibición de la ECA
	Proteasa D3	NWGPLY (21 µM) PNKPFQ (33 µM) IPPGVPYWT (64 µM) YVVK (44 µM)	Inhibición de la ECA Reduce presión sanguínea en ratas hipertensas
		DLP (4,8 µM) DG (12,3 µM)	Inhibición de la ECA
	Alcalasa	No determinado	Antioxidante
		No determinado *	Antioxidante Antiinflamatoria
	Termolisina, pepsina y tripsina	IVF (5,4 µM) LLF (6,7 µM) LNF (5,2 µM) LSW (3,4 µM) LEF (4,6 µM)	Inhibición de la ECA

\* Previa germinación.



Alimentos fermentados				
Leguminosa	Microorganismo	Péptido (IC <sub>50</sub> )	Bioactividad	Referencias
Pasta de soja	<i>L. mesenteroides</i> , <i>T. halophilus</i> , <i>E. faecium</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>R. oligosporus</i>	HHL (2,2 µg/mL)	Inhibición de la ECA Reduce presión sanguínea en ratas hipertensas Antioxidante	Shin y col. (2001)
				Gibbs y col. (2004)
Salsa de soja	<i>A. oryzae</i>	AF (165,3 µM) IF (65,8 µM)	Inhibición de la ECA	Zhu y col. (2008)
		LVQGS (43,7 µM)		Rho y col. (2009)
	<i>A. sojae</i>	AW (10 µM) GW (30 µM) AY (48 µM) SY (67 µM) GY (97 µM)	Reduce presión sanguínea en ratas hipertensas	Nakahara y col. (2010a,b)
Leche de soja	<i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. bifidobacterium</i>	(0,003 mg/mL)**		Tsai y col. (2006)
Harina de soja	<i>E. faecium</i>	(39,5 mg/mL)	Inhibición de la ECA Antioxidante Antiinflamatoria	Martínez-Villalunga y col. (2012)
Lecitina de soja	<i>B. subtilis</i> natto	(0,02 mg/mL)	Inhibición de la ECA	Wang y col. (2013)
	<i>L. casei</i> ssp. <i>pseudoplatanturum</i>	LIVTQ (0,017 mg/mL)		Vallabha y Tiku (2014)

\*\* Posterior hidrólisis con Prozyme 6

### 2.5.3 Polifenoles

El término polifenol agrupa a una serie muy heterogénea de compuestos que se caracterizan por presentar un anillo aromático con al menos un radical hidroxilo y una cadena lateral funcional. Debido a su complejidad estructural, los polifenoles o compuestos fenólicos se clasifican, teniendo en cuenta la estructura química de su esqueleto carbonado, en las siguientes familias: los compuestos fenólicos no flavonoideos, entre los que se encuentran los ácidos y aldehídos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos; los compuestos fenólicos flavonoideos como los flavonoles, flavonas, flavanonas e isoflavonas, antocianidinas y los flavan-3-oles conocidos normalmente como catequinas que son la base de los taninos condensados; los compuestos fenólicos polimerizados que incluyen taninos y ligninas; y los compuestos fenólicos minoritarios como quinonas, estilbenos y betacianinas (Tabla 3).

Las leguminosas son una fuente importante de polifenoles y su composición y contenido varía notablemente no sólo debido a factores genéticos dependiendo de la especie y variedad a la que pertenezcan, sino también debido a factores edafoclimáticos durante su cultivo, estado de madurez y condiciones de almacenamiento de la semilla (Dueñas y col., 2006). En la Tabla 4 se incluye el contenido en compuestos fenólicos totales de las leguminosas de consumo humano más representativas y, de todas ellas, la lenteja destaca por presentar el contenido más alto, hasta 753 mg GAE/100g de su peso seco.

Tabla 3: Familias de compuestos fenólicos

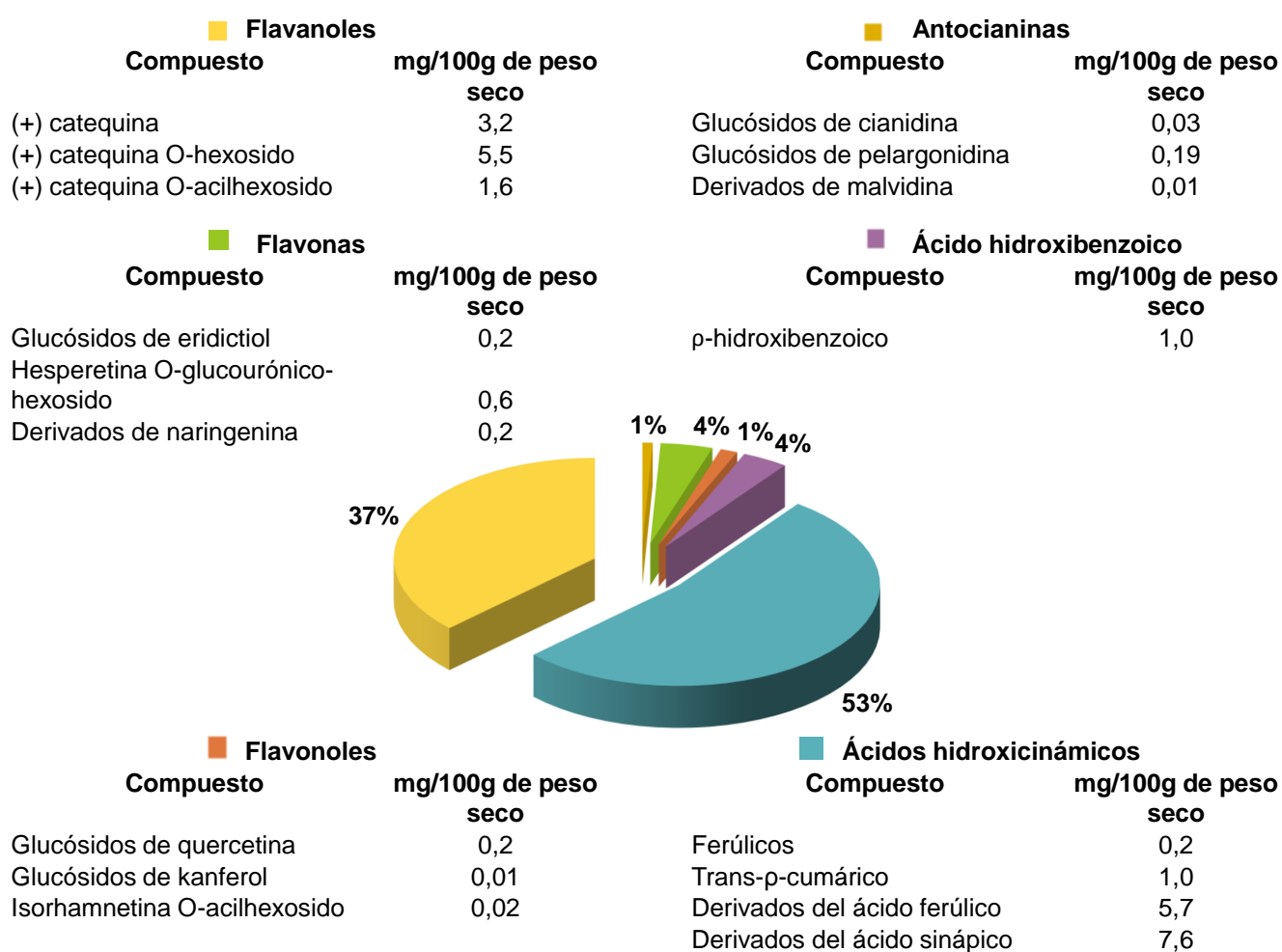
<b>Compuestos fenólicos no flavonoideos</b>	
$C_6$	Fenoles sencillos
$C_6-C_1$	Alcoholes, aldehídos, cetonas y ácidos benzoicos
$C_6-C_2$	Acetofenonas Alcoholes y ácidos fenilacéticos Ácidos mandélicos
$C_6-C_3$	Alcoholes, aldehídos y ácidos cinámicos Alcoholes y ácidos 3-fenil-1-propanoicos Cumarinas Isocumarinas Cromonas
<b>Compuestos fenólicos flavonoideos</b>	
$C_6-C_3-C_6$	Calconas, dihidrocalconas Flavonas, flavanonas Isoflavonas Flavonoles, flavanonoles Antocianos Auronas Flavanoles
<b>Compuestos fenólicos polimerizados</b>	
$(C_6-C_1)_n$	Taninos hidrolizables
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Taninos condensados
$(C_6-C_3)_n$	Ligninas
<b>Compuestos fenólicos minoritarios</b>	
$C_6, C_{10}, C_{14}$	Quinonas
$C_6-C_1-C_6$	Benzofenonas, xantonas
$C_6-C_2-C_6$	Estilbenos
$C_{18}$	Betacianinas
$C_{30}$	Biflavonoides

Tabla 4: Contenido en compuestos fenólicos totales de las leguminosas

Leguminosa	Fenoles totales (mg GAE /100 g)	Referencia
Judía mungo	355	Turkmen y col. (2005)
Guisante	183	
Guisante verde	107-153	Xu y Chang (2007)
Guisante amarillo	113-167	
Lenteja	102-753	
Garbanzo	141-167	
Judía roja	123-590	
Judía negra	128-689	

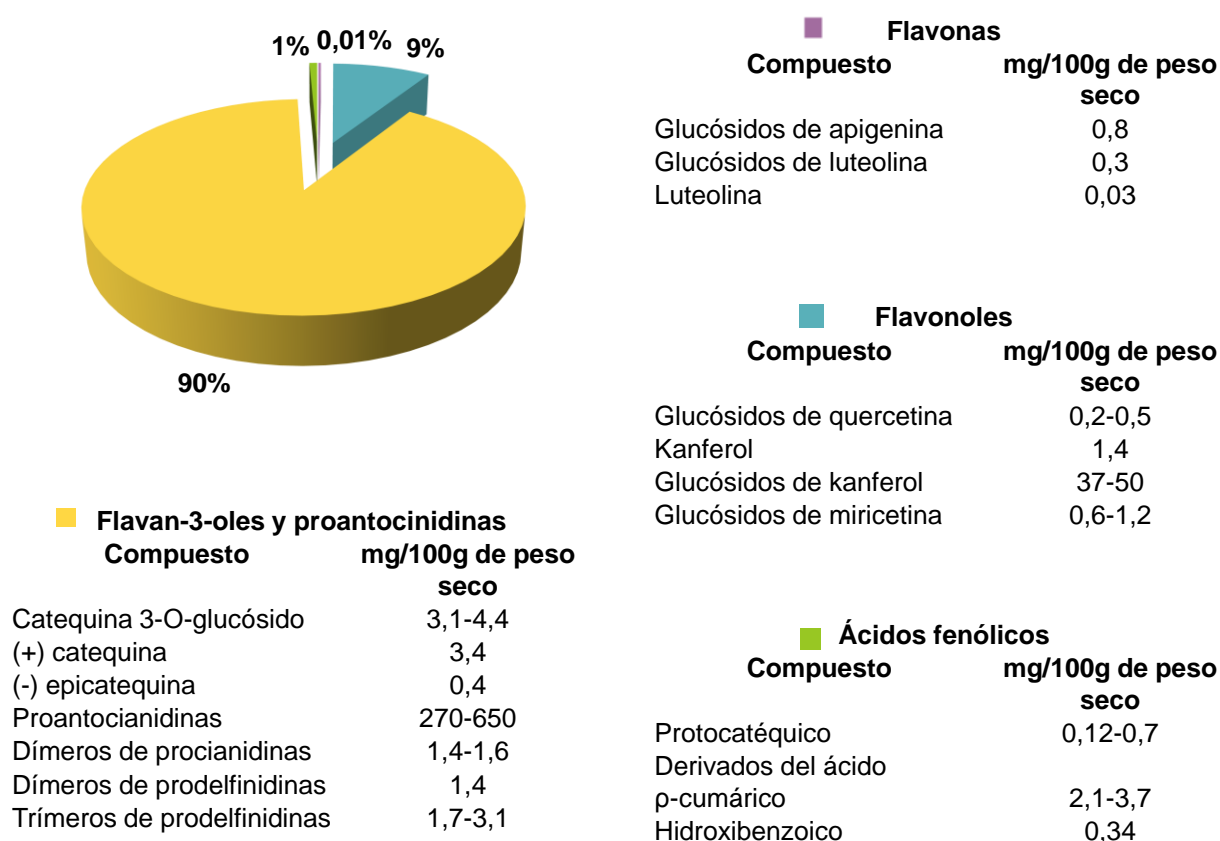
En las leguminosas se encuentran representadas la mayor parte de las familias de los compuestos fenólicos. Referente a los compuestos no flavonoideos, generalmente se encuentran en forma libre como ésteres solubles o unidos a polisacáridos y a proteínas. En la testa de las leguminosas, que es el tejido más rico en polifenoles (Dueñas y col., 2006), se han identificado ésteres solubles de los ácidos *p*-hidroxibenzoico, protocatéquico, siríngico, gálico, trans-*p*-cumárico y trans-ferúlico. Dentro del grupo de los flavonoides, en las leguminosas se encuentran los flavanoles, flavan-3-oles, isoflavonas, flavonas, flavanonas y antocianos, estando la mayoría de ellos presentes en forma glicosilada (Dueñas y col., 2004, Lopez-Amoros y col., 2006).

La judía es la leguminosa más rica en ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos) y derivados. A modo de ejemplo, la Figura 5 recoge los principales compuestos fenólicos identificados en la judía pinta.



**Figura 5: Composición fenólica de la judía pinta (Phenol-Explorer database: [www.phenol-explorer.eu/food](http://www.phenol-explorer.eu/food)).**

La lenteja es la leguminosa más rica en flavonoides, cuya composición fenólica se esquematiza en la Figura 6. Esta leguminosa destaca por su elevado contenido en proantocianidinas, que llegan a alcanzar concentraciones entre 270 y 650 mg/100 g (Jin y col., 2012). Las proantocianidinas que se han descrito en lenteja son de tipo B y están compuestas por subunidades de catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina y (+)-galocatequina, siendo más abundantes los polímeros de grado de polimerización de 7 a 9, seguidos de oligómeros de entre 4 y 5 subunidades (Dueñas y col., 2003).



**Figura 6: Composición fenólica de la lenteja (Phenol-Explorer database: [www.phenol-explorer.eu/foods](http://www.phenol-explorer.eu/foods); Jin y col., 2012).**

Los polifenoles son los compuestos que más contribuyen a la actividad antioxidante de leguminosas (Oomah y col., 2011). Dueñas y col. (2006) demostraron que las flavonas, flavonoles y proantocianidinas contribuyen en mayor medida a la actividad antioxidante de la testa de lentejas y guisantes, mientras que la catequina lo hace en la actividad antioxidante del cotiledón. La actividad antioxidante de extractos de leguminosas ricos en polifenoles se ha confirmado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (Reynoso-Camacho y col., 2006; Yao y col., 2012; Talukdar, 2013; Zhao y col., 2014). Los mecanismos de acción por los que los compuestos fenólicos ejercen actividad antioxidante engloban la neutralización de radicales libres, el efecto quelante sobre iones metálicos, la inhibición de enzimas implicadas en la producción de ERO (Rocha-Guzmán y col., 2007; Aguilera y col., 2010) y la activación de la expresión de enzimas implicadas en la detoxificación celular como la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa, la glutatión S-transferasa y la NADPH quinona oxidoreductasa 1 (NQO1)

(Oomah y col., 2010; Spanou y col., 2012). A través de todos estos mecanismos se sugiere que los polifenoles poseen un efecto beneficioso en la hipertensión mejorando la disfunción endotelial causada por el estrés oxidativo (Vita, 2005).

Otro mecanismo crucial por el que los polifenoles pueden prevenir o controlar la hipertensión incluye el aumento de la biodisponibilidad del ON en el endotelio vascular (Eyster y col., 2012). Se ha descrito que los polifenoles de la judía reducen la presión sanguínea en modelos animales de hipertensión aumentando la producción de ON a través de la modulación de la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en la aorta y el riñón (Mukai y Sato, 2009).

En la actualidad, existe una amplia información científica sobre los mecanismos de acción de isoflavonas en la regulación de la presión arterial que han sido revisados recientemente por Eyster y col. (2012). Estos compuestos fenólicos pueden regular la presión arterial mediante efectos vasodilatadores, inhibidores de la vasoconstricción, antioxidantes y efectos positivos en la función renal. Los efectos vasodilatadores de las isoflavonas pueden mediar por mecanismos dependientes o independientes del endotelio vascular. Las isoflavonas, al igual que otros flavonoides de leguminosas, ejercen efectos vasodilatadores actuando en el SRAA a través de la inhibición de la ECA (Ojeda y col., 2010). La reducción de la vasoconstricción mediada por isoflavonas ocurre a través de su interacción con canales iónicos en las células del músculo liso vascular o regulando la expresión génica mediada por los receptores de esteroides (receptor activador del proliferador de peroxisomas, PPAR; receptor X del pregnano, PXR) o los receptores de estrógeno (Eyster y col., 2012).

Por último, la actividad antiinflamatoria de los polifenoles también puede contribuir a mejorar la función endotelial y prevenir o atenuar el desarrollo de la hipertensión (Khurana y col., 2013). Los polifenoles inhiben enzimas implicadas en la síntesis de mediadores inflamatorios como la ciclooxigenasa 2 (COX-2), la lipooxigenasa (LPO) y la citocromo P450 monooxigenasa (Mitjavila y Moreno, 2012; Khurana y col., 2013). Adicionalmente a este mecanismo, los polifenoles de leguminosas pueden interferir con las rutas de señalización celular involucradas en la inflamación (Vazquez-Prieto y col., 2012).

### 2.5.4 Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA)

El GABA es un aminoácido libre no proteico de cuatro carbonos que se encuentra ampliamente distribuido en bacterias, plantas y vertebrados.

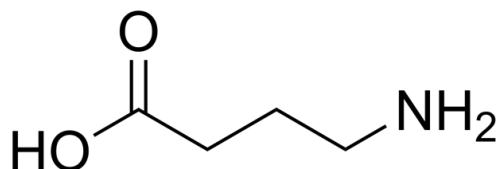


Figura 7: Molécula del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA).

Este aminoácido se forma a partir de la  $\alpha$ -descarboxilación del ácido glutámico por la enzima glutamato descarboxilasa (GD; EC. 4.1.1.15) (Satya-Narayan y Nain, 1990). En las plantas, su actividad está regulada por la calmodulina (Bouche y Fromm, 2004) y es estimulada por la falta de oxígeno y la acidificación del medio (Rhodes, 2009). En plantas y animales, el GABA, una vez sintetizado, puede continuar en la denominada “shunt GABA” para generar ATP por la acción de dos enzimas mitocondriales, la GABA transaminasa (GABA-T) y la succinato semialdehído deshidrogenasa (SSADH), jugando un papel esencial en el metabolismo celular.

En los animales, el GABA se encuentra en el cerebro en altas concentraciones y juega un papel fundamental en la neurotransmisión. Aproximadamente, el 60-75% de todas las sinapsis son GABAérgicas (Schwartz, 1988). Mediante la activación de los receptores de GABA se promueve la tasa de crecimiento de los procesos neuronales, facilita la formación de sinapsis y promueve la síntesis de proteínas específicas. Los receptores de GABA están localizados en la membrana postsináptica y se clasifican en tres grupos: A o alfa, B o beta y C o gamma.

Los receptores GABA<sub>A</sub> median las transmisiones sinápticas inhibitorias rápidas regulando la excitación neuronal y los cambios rápidos de humor. Así, la ansiedad, el pánico y las respuestas al estrés son regulados por los receptores GABA<sub>A</sub> (Borden y col., 1994). Los receptores GABA<sub>B</sub> median las transmisiones inhibitorias lentas que parecen ser importantes en la memoria, el estado de ánimo y el dolor (Meldrum y Chapman, 1999). El papel fisiológico de los receptores GABA<sub>C</sub> aún se desconoce.



Las alteraciones en los circuitos GABAérgicos están asociados con la corea de Huntington, la enfermedad de Parkinson, la demencia senil, la enfermedad de Alzheimer y la esquizofrenia (Wong y col., 2003). Por ejemplo, se ha descrito que en los enfermos de Alzheimer la concentración de GABA en el cerebro está por debajo de la normalidad (Seidl y col., 2001). La administración oral o venosa no cambia las concentraciones de GABA en el cerebro ya que este aminoácido es impermeable a la barrera hematoencefálica (Hayakawa y col., 2004), por lo tanto, la administración de GABA no ha encontrado su aplicación clínica en el tratamiento de enfermedades mentales.

En cambio, el GABA ha adquirido un gran interés científico como agente antihipertensivo. Numerosos estudios científicos en animales de experimentación y humanos han demostrado que el consumo de alimentos ricos en GABA o la inyección directa de este aminoácido reduce significativamente la presión sanguínea (Diana y col., 2014). Algunos de estos estudios fueron realizados con alimentos derivados de leguminosas ricos en GABA. Por ejemplo, la presión sistólica en ratas espontáneamente hipertensas disminuyó notablemente después de 8 semanas de administración oral de bebida de soja rica en GABA (1,36 mg GABA/kg peso/d) (Liu y col., 2011). De forma similar, el consumo de salsa de soja enriquecida en GABA (1 mg/kg peso/d) durante 6 semanas redujo la presión sanguínea sistólica (Yamakoshi y col., 2007). Otros estudios observaron los mismos resultados al administrar soja fermentada o un suplemento de soja, ambos ricos en GABA, a la dieta de animales de experimentación espontáneamente hipertensos (Aoki y col., 2003; Shizuka y col., 2004).

Los efectos antihipertensivos que resultan de la administración oral de GABA han sido explicados por sus acciones en los tejidos periféricos (vasos sanguíneos y sistema nervioso autónomo). El GABA inhibe el aumento de la presión de perfusión inducida por la estimulación de los nervios perivasculares regulando y estabilizando la presión sanguínea (Hayakawa y col., 2004). También parece ejercer una acción hipotensora mediante la inhibición de la liberación de noradrenalina por las fibras nerviosas simpáticas del lecho arterial mesentérico uniéndose a los receptores GABA<sub>B</sub> presinápticos (Hayakawa y col., 2004).

El GABA está presente de forma natural en las semillas de leguminosas en bajas concentraciones (0,25-0,46 mg/g peso seco) (Martínez-Villaluenga y col., 2006). Sin

embargo, los procesos biotecnológicos como la germinación o fermentación disparan la síntesis de GABA, con lo que los alimentos derivados de leguminosas obtenidos por estos procedimientos suponen un aporte importante de este aminoácido (1,1-3,7 mg/g peso seco) (Martínez-Villaluenga y col., 2006; Yamakoshi y col., 2007; Pradeep y col., 2011; Liao y col., 2013). Por este motivo, ambos procesos han sido seleccionados para el diseño de alimentos con potencial actividad antihipertensiva.

## **2.6 Empleo de procesos tecnológicos para favorecer la síntesis de compuestos bioactivos en las leguminosas**

La aplicación de procedimientos tecnológicos a las semillas de leguminosas ha permitido poder incorporarlas a la dieta de los humanos desde tiempos ancestrales y convertirlas en alimentos comestibles especialmente nutritivos que han contribuido al desarrollo y la evolución. Entre ellos, la germinación y la fermentación se han utilizado ampliamente con estos fines, ya que ambos conducen a la modificación de los constituyentes presentes en las leguminosas así como a fenómenos hidrolíticos que provocan una disminución de la concentración de compuestos no nutritivos y una mejora de su calidad nutritiva, funcional y de sus propiedades organolépticas (Starnzynska-Janiszewska y col., 2012; López y col., 2013).

### **2.6.1 Germinación.**

#### **2.6.1.1 Modificación de los constituyentes de las leguminosas durante la germinación.**

La germinación de leguminosas para consumo humano tiene su origen en los países de Oriente, donde estos alimentos constituyen una parte importante de la dieta de la población desde hace siglos. En los últimos años, sin embargo, los germinados de leguminosas han ganado gran popularidad entre los consumidores en los países occidentales, al considerarse alimentos saludables de alto valor nutritivo, que pueden ser consumidos crudos o elaborados.

La germinación es un proceso metabólico de enorme complejidad en el que la semilla pasa de un estado quiescente a una fase metabólica activa responsable de proporcionar la energía y nutrientes necesarios para el desarrollo de la nueva planta

(Paucar-Menacho y col., 2010). Este proceso implica una gran variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos en la semilla que incluyen la síntesis, transformación y degradación de los compuestos (Rumiyati y col., 2013). La germinación comienza con la absorción de agua por parte de la semilla y finaliza con la emergencia de la plántula a través de las cubiertas. Para que la germinación tenga lugar, es necesario que existan factores externos favorables: humedad responsable de la hidratación de la semilla, disponibilidad de oxígeno que permita la respiración aerobia y temperatura adecuada para que se inicien los procesos metabólicos que darán lugar al desarrollo de la nueva planta (Nonogaki y Bassel, 2010).

Durante la germinación se activan enzimas amilolíticas, lipolíticas y proteolíticas que hidrolizan los compuestos de reserva de la semilla y se modifican las características nutritivas, funcionales y organolépticas de los germinados obtenidos. Existe una extensa información bibliográfica indicando que la germinación mejora la calidad nutricional de las leguminosas al aumentar la digestibilidad de proteínas y almidón, el contenido de fibra dietética, de azúcares sencillos (Vidal-Valverde y col., 1992; Frias y col., 1996; Urbano y col., 2005; Ghavidel y Prakash, 2007; Torres y col., 2007; Martín-Cabrejas y col., 2008; Benitez y col., 2013), de aminoácidos libres (Kuo y col., 2004; Martínez-Villaluenga y col., 2006), la disponibilidad de la lisina (Rodríguez y col., 2007), la disponibilidad de minerales (Khalil, 2001; Mbithi-Mwikya y col., 2001; Ghavidel y Prakash, 2007) y la biosíntesis de vitaminas (Frias y col., 2005; Fernandez-Orozco y col., 2006; Doblado y col., 2007; Sangronis y Machado, 2007; Guo y col., 2012; Huang y col., 2014). Conjuntamente con el aporte nutricional que supone, la germinación es un proceso atractivo por ocasionar un descenso en la concentración de compuestos no nutritivos (Frias y col., 1995,1996; Kozłowska y col., 1996; Mwikya y col., 2001; Martínez-Villaluenga y col., 2008) y una de las razones por las que se les atribuye un valor añadido saludable.

A parte de la mejora nutritiva que atrae la atención sobre los germinados de leguminosas, este proceso tiene un efecto relevante sobre las proteínas de las leguminosas. Durante la germinación, las proteínas son hidrolizadas a polipéptidos, péptidos y aminoácidos más fácilmente asimilables, como consecuencia de la activación de las enzimas proteolíticas (Urbano y col., 2005; Martínez-Villaluenga y col., 2006; Rodríguez y col., 2007; Gulewicz y col., 2008). Bandad y col. (2009) observaron el

aumento en los niveles de proteasas ácidas, neutras y alcalinas durante los primeros días de germinación de la lenteja. Estos autores pusieron de manifiesto la liberación de péptidos bioactivos con actividad inhibidora de la ECA durante la germinación de lenteja en oscuridad a 20°C durante 5 días. Así mismo, Paucar-Menacho y col. (2010) observaron un incremento del 62% en los niveles de lunasina, péptido con reconocidas propiedades anticancerígenas, tras la germinación de soja a 42°C durante 5 días.

La inducción del metabolismo en las semillas durante la germinación también afecta al contenido y la composición de compuestos fenólicos, siendo este efecto dependiente tanto del tipo de leguminosa como de las condiciones de germinación. Estudios realizados en diferentes cultivares de soja pusieron de manifiesto que la germinación en presencia o ausencia de luz a temperaturas comprendidas entre 20°C y 35°C durante 63-168 h incrementaba los niveles de isoflavonas (Kim y col., 2006; Lin y Lai, 2006; Paucar-Menacho y col., 2010; Huang y col., 2014; Qunhone-Junior e Ida, 2015). En judía mungo, algunos autores han observado una reducción de la concentración de polifenoles totales durante la germinación en cortos periodos de tiempo (12-24 h) (Grewal y Jood, 2006; Hardeep y col., 2011) debido, principalmente, a su solubilización y posterior eliminación en el agua de remojo utilizada previamente al proceso de germinación. Sin embargo, la mayor parte de estudios realizados en leguminosas como lentejas, judías, altramuz y guisantes indican un aumento del contenido de polifenoles totales durante la germinación en presencia o ausencia de luz (Fernández-Orozco y col., 2006; Kim y col., 2012; Shohag y col., 2012; Rumiya y col., 2013; Tajoddin y col., 2014). Este aumento parece ser debido, sobre todo, al incremento de flavonoides (Dueñas y col., 2009; Guo y col., 2012; Lopez y col., 2013; Pajak y col., 2014). No obstante, algunos autores han observado un aumento de derivados hidroxicinámicos tras la germinación de judía y altramuz a 20°C durante un periodo de 6-9 días, en presencia o en ausencia de luz (Lopez-Amoros y col., 2006; Dueñas y col., 2009), si bien se ha puesto de manifiesto la disminución de la concentración de estos compuestos durante la germinación de lenteja a 20°C en oscuridad durante 7 días (Troszynska y col., 2011). El contenido de ácidos hidroxibenzoicos, sin embargo, experimenta diferentes modificaciones durante el proceso, dependiendo del tipo de leguminosa estudiada. En este sentido, Dueñas y col. (2009) observaron una disminución progresiva de esta familia de compuestos fenólicos durante la germinación de altramuz a

20°C en oscuridad durante 9 días, mientras que Lopez-Amoros y col. (2006) indicaron que estos ácidos aumentaron tras la germinación de judías, lentejas y guisantes a 20°C en presencia o ausencia de luz durante 6 días. Es importante señalar que durante el proceso de germinación de leguminosas se produce, además, un aumento de los compuestos fenólicos libres por hidrólisis de aquellos unidos a polímeros de la pared celular, incrementándose así su disponibilidad en el intestino delgado (Guo y col., 2012).

El incremento en el contenido de compuestos fenólicos totales y las modificaciones en la composición fenólica durante el proceso de germinación de leguminosas se refleja en las propiedades biológicas de los germinados resultantes. La germinación de soja, soja negra y judía mungo en oscuridad o periodos de luz/oscuridad (12 h luz, 12 h oscuridad) a 20-25°C durante un intervalo de tiempo comprendido entre 4 y 9 días mejoró la capacidad atrapadora de radicales DPPH (Lim y Lai, 2006; Guo y col., 2012; Kim y col., 2012; Huang y col., 2014; Pajak y col., 2014). La germinación en oscuridad a 20-25°C hasta 9 días aumentó la actividad antioxidante del altramuza entre un 28% y 1400% (Frias y col., 2005; Fernández-Orozco y col., 2006; Dueñas y col., 2009; Rumiyati y col., 2013). Este fenómeno ha sido también observado en judías y guisantes germinados en ausencia o presencia de luz a 20°C durante un periodo de hasta 9 días, si bien el mayor incremento de actividad antioxidante se observó durante la germinación en oscuridad durante 6 días para la judía y en presencia de luz durante 4 días para el guisante (López-Amorós y col., 2006). Algunos autores, no obstante, han observado una disminución de la actividad antioxidante de lenteja, judía negra y soja durante la germinación en presencia/ausencia de luz a 20-25°C durante un periodo de hasta 8 días (Zielinski y col., 2003; López-Amorós y col., 2006; Swieca y col., 2012; Guajardo-Flores y col., 2013). Por otra parte, McCue y col. (2005) indicaron un aumento de la capacidad inhibidora de la ECA tras la germinación de soja durante 10 días en oscuridad, fenómeno que estos autores relacionaron con el incremento de compuestos fenólicos durante este proceso.

Durante la germinación, el contenido en GABA también sufre modificaciones y diversos autores observaron una acumulación de sus niveles durante la germinación de soja, altramuza, haba y judía adzuki (Martínez-Villaluenga y col., 2006; Li y col., 2009; Guo y col., 2012).

Por todo lo expuesto, se puede deducir que la selección de las condiciones óptimas de germinación es crucial para maximizar el contenido en compuestos bioactivos y las actividades biológicas en los germinados obtenidos a partir de leguminosas. Este hecho, junto con las connotaciones de alimentos nutritivos saludables y sus características organolépticas, hace que los germinados sean muy apreciados por el consumidor y supone una estrategia natural para incrementar el consumo de leguminosas.

#### **2.6.1.2 Empleo de elicitores durante la germinación para maximizar el contenido en compuestos bioactivos y las propiedades biológicas de las leguminosas.**

La composición fitoquímica de los vegetales varía de acuerdo a factores genéticos (familia, cultivar), fisiológicos (edad, órgano, estado de maduración) y factores agronómicos (estrés, fotoperiodo, fertilización) (Baenas y col., 2014). Entre estos últimos, el estrés es uno de los factores que produce mayores alteraciones en el contenido y composición de metabolitos secundarios bioactivos en los vegetales.

Los elicitores químicos son sustancias que inducen cambios fisiológicos en las plantas y como respuesta se activan mecanismos de defensa similares a los que actúan en situaciones de estrés como infecciones por patógenos o determinados factores ambientales. Se activan así rutas enzimáticas que conducen a la síntesis de compuestos fitoquímicos (Baenas y col., 2014), por lo que el empleo de elicitores durante el desarrollo de los vegetales puede, por tanto, constituir una herramienta muy útil para potenciar la síntesis de compuestos bioactivos. Numerosos estudios han demostrado que el uso de elicitores durante la germinación de leguminosas da lugar a una mejora del rendimiento del proceso, así como de la calidad nutricional y del contenido de fitoquímicos de los germinados obtenidos. En este sentido, el tratamiento con quitosanos en concentraciones del 0,01%-0,5% durante la germinación de soja aumentó la tasa de crecimiento y el tamaño de los germinados, así como su contenido en vitamina C (Choi y col., 2000; No y col., 2003). Concentraciones de ácido ascórbico entre 0,25 y 1,0 g/L durante la germinación han demostrado ser eficaces para incrementar los niveles de polifenoles totales y la capacidad antioxidante del haba germinada (Randhir y Shetty, 2007). De la misma manera, la adición de ácido ascórbico 50-500  $\mu\text{M}$  o de ácido fólico 50  $\mu\text{M}$  durante

la germinación de guisante potenció el crecimiento y vigor de los germinados resultantes, así como la acumulación de vitamina C y de compuestos fenólicos (Burguières y col., 2007). Estudios realizados en judía mungo, haba y judía terciopelo indicaron que la adición de otros elicitores como hidrolizados de proteína de pescado, lactoferrina y extracto de orégano durante la germinación estimulaban la síntesis de compuestos fenólicos y L-DOPA y se mejoraba, además, el vigor de los germinados y su actividad antioxidante (Randhir y col., 2003, 2004, 2009). El uso de elicitores precursores de la síntesis de compuestos fenólicos como la fenilalanina en una concentración 0,1 mM durante la germinación de lenteja favoreció la acumulación de compuestos flavonoides y aumentó la capacidad antioxidante de los germinados obtenidos (Swieca y col., 2014b). En otras semillas como el arroz, la utilización de elicitores durante la germinación ha demostrado ser una herramienta eficaz para favorecer la síntesis de GABA. A este respecto, Oh (2003) observó que la germinación de arroz en soluciones de quitosano (50 ppm en ácido láctico 5 mM) y de quitosano + ácido glutámico (50 ppm en ácido glutámico 5 mM), así como de ácido glutámico 5 mM aumentó significativamente la concentración de GABA en comparación con las semillas no germinadas y aquellas germinadas en presencia de agua. Estas observaciones indican la efectividad de la aplicación de elicitores durante la germinación para potenciar el contenido en fitoquímicos, tratamiento que puede ser aprovechado para la obtención de alimentos e ingredientes funcionales derivados de leguminosas.

### **2.6.2 Fermentación.**

La fermentación es uno de los métodos más antiguos y económicos de conservación de los alimentos. Este proceso biotecnológico consiste en la modificación intencionada de los alimentos por la acción de determinados microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) que crecen en el sustrato consumiendo parte de sus compuestos y lo enriquecen con los productos de su metabolismo (Deshpande y col., 2000). La fermentación presenta 4 ventajas principales (Bourdichon y col., 2012):

- 1 Prolonga la vida útil de los alimentos a través de la formación de metabolitos inhibidores del crecimiento bacteriano como ácidos orgánicos y bacteriocinas, generalmente en combinación con la disminución de la actividad de agua.

- 2 Mejora la seguridad alimentaria por inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos o eliminación de compuestos tóxicos.
- 3 Mejora el valor nutricional de los alimentos.
- 4 Mejora la calidad organoléptica de los alimentos.

La fermentación ha sido un proceso empleado tradicionalmente en el procesado de leguminosas para eliminar factores no nutritivos, mejorar la textura y propiedades organolépticas, aumentar el valor nutricional, mejorar la digestibilidad proteica y reducir la alergenicidad (Doblado y col., 2003; Frias y col., 2008; Starzyńska-Janiszewska y col., 2014).

El proceso fermentativo en las leguminosas puede ser llevado a cabo por los microorganismos naturalmente presentes en las semillas (fermentación natural) o mediante la adición de cultivos iniciadores específicos (fermentación inducida). En el caso de la fermentación natural, la calidad del producto final va a depender del tipo de microorganismos presentes en la superficie de las semillas. En cambio, el empleo de cultivos iniciadores en la fermentación permite minimizar el impacto de esta fuente de variación, facilitando la uniformidad y la calidad del producto fermentado (Leroy y De Vuyst, 2004; Wiander y Ryhänen, 2005).

Generalmente, la fermentación de leguminosas se lleva a cabo mediante bacterias ácido lácticas (BAL), ya que están naturalmente presentes en las semillas. Las BAL contribuyen no sólo al desarrollo de las propiedades nutricionales y sensoriales deseadas en el producto sino que, además, garantizan su seguridad microbiológica por la producción de ácidos orgánicos que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos (Juodeikiene y col., 2012). Sin embargo, otras bacterias como *Bacillus subtilis* y hongos como los de los géneros *Rhizopus* y *Aspergillus* se emplean también con éxito para dirigir la fermentación en fase sólida de diversas leguminosas (Egounlety y Aworh, 2003; Hong y col., 2004; Fernández-Orozco y col., 2008; Dueñas y col., 2012; Niveditha y col., 2012).

Existe una extensa bibliografía que describe la fermentación como un proceso que mejora el valor nutricional de las leguminosas. En general, la fermentación incrementa la



disponibilidad del almidón (Granito y col., 2002; Doblado y col., 2003; Torres y col., 2006), fuente principal de energía para el crecimiento de los microorganismos, y disminuye el contenido de los carbohidratos  $\alpha$ -galactósidos (rafinosa, estaquiosa y verbascosa) aumentando el contenido en monosacáridos y disacáridos (Granito y col., 2002, 2003, 2005a; Torres y col., 2007; Madodé y col., 2013; Starzynska-Janiszewska y col., 2014). La fermentación ocasiona una disminución de los niveles de fibra soluble (Martín-Cabrejas y col., 2004; Torres y col., 2006), si bien los de fibra insoluble se mantienen sin sufrir modificaciones (Martín-Cabrejas y col., 2004) o disminuyen ligeramente (Granito y col., 2005b) dependiendo de las condiciones de fermentación. Este proceso, además, produce un incremento de los niveles de vitaminas del grupo B, mientras que las concentraciones de las vitaminas C y E parecen depender de las condiciones de fermentación y del tipo de leguminosa (Granito y col., 2005a; Doblado y col., 2005; Frias y col., 2005; Torres y col., 2005; Torres y col., 2006; Fernández-Orozco y col., 2008; Niveditha y Sridhar, 2014). Por otra parte, la fermentación ocasiona una notable disminución del contenido de factores no nutritivos de las leguminosas, como así se ha descrito en numerosos artículos científicos (Tabera y col., 1995; Frias y col., 1996a; Kozłowska y col., 1996; Granito y col., 2002; Cuadrado y col., 2002; Doblado y col., 2003; Egounlety y Aworh, 2003).

Las proteínas de las leguminosas sufren importantes modificaciones durante la fermentación ya que son hidrolizadas por los microorganismos fermentativos. Por este motivo, la fermentación puede constituir un método alternativo a la hidrólisis enzimática en la producción de péptidos bioactivos a partir de proteínas de leguminosas. El sistema proteolítico de las BAL es muy complejo e incluye proteinasas asociadas a la pared celular y peptidasas de amplio espectro (endopeptidasas, aminopeptidasas, tripeptidasas y dipeptidasas), mientras que *B. subtilis* produce gran cantidad de proteasas extracelulares (Geethanjali y Subash, 2011). Los estudios realizados hasta el momento indican que las BAL y *B. subtilis* presentan un enorme potencial para la producción de péptidos biológicamente activos por su capacidad de hidrolizar globulinas de leguminosas como la soja (Kiers y col., 2000; Frias y col., 2008; Martínez-Villaluenga y col., 2012). Además, diversos autores han puesto de manifiesto la liberación de péptidos antioxidantes durante la fermentación de las proteínas de soja con *B. subtilis* o *Rhizopus oligosporus* durante la elaboración de tempeh y natto (Gibbs y col., 2004). Así mismo, se

han identificado péptidos antihipertensivos potentes en distintos productos de soja fermentados con diferentes cepas de *B. subtilis* (Shin y col., 2001; Wang y col., 2013), BAL (Tsai y col., 2006; Vallabha y Tuky, 2014) y hongos del género *Aspergillus* (Zhu y col., 2008; Rho y col., 2009; Nakahara y col., 2010a). Fan y col. (2009) describieron la presencia de péptidos inhibidores de la ECA en douchi, un alimento tradicional asiático obtenido mediante fermentación de la soja con *Aspergillus* spp., mientras que Martínez-Villaluenga y col. (2012) obtuvieron péptidos con actividades antiinflamatoria, antioxidante e inhibidora de la ECA mediante fermentación de leche de soja con *Enterococcus faecium*.

Por lo que se refiere a los compuestos fenólicos, su contenido y composición sufren cambios significativos durante la fermentación de leguminosas, fenómeno que se refleja, por lo general, en un aumento de su actividad antioxidante. En este sentido, se ha descrito que la fermentación natural de diversas legumbres industrialmente infrautilizadas (*Cajanus cajan* L. Millsp, *Vigna subterranea* L. y *Sphenostylis stenocarpa*) y de judía común causa un incremento significativo del contenido de polifenoles solubles libres y una disminución del contenido de polifenoles unidos a compuestos de la pared celular, incrementando consecuentemente su actividad antioxidante (Oboh y col., 2009). Así mismo, la fermentación con BAL produce un aumento de (+)-catequina y ácidos hidroxibenzoicos en lentejas (Bartolomé y col., 1997). La fermentación de judía carilla con *L. plantarum* dio lugar a la disminución de formas conjugadas de derivados ferúlicos y *p*-cumáricos, formación de tirosol, aumento de quercetina a partir de la hidrólisis de quercetina glucósidos y reducción de derivados hidroxicinámicos (Dueñas y col., 2005). Más recientemente, se ha observado que la fermentación de soja con hongos filamentosos y BAL conduce a la formación de ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos, al aumento de isoflavonas agliconas a partir de la hidrólisis de isoflavonas glucósidos y de flavanoles a partir de la hidrólisis de flavanoles galato (Chiang y Pang, 2011; Chung y col., 2011; Da Silva y col., 2011; Dueñas y col., 2012). Los cambios en la composición fenólica producidos durante la fermentación se deben a la actividad de enzimas microbianas como la  $\beta$ -glucosidasa, esterasas, descarboxilasas o reductasas. La  $\beta$ -glucosidasa presente en las BAL cataliza la hidrólisis de enlaces o-glucósido de los flavonoides glucósidos liberando agliconas bioactivas (Malashree y col., 2012). Las esterasas como la tanasa pueden hidrolizar enlaces tipo éster de diversos

compuestos fenólicos, como en las proantocianidinas y ésteres del ácido gálico y libera, además, derivados hidroxycinámicos unidos a la pared celular, como se ha demostrado en lenteja y guisante (Dueñas y col., 2006, 2007). La tanasa, adicionalmente, cataliza la conversión de flavanonas glucósidos a agliconas (Ferreira y col., 2013; Jimenez y col., 2014). Por otra parte, las enzimas descarboxilasas de ácidos fenólicos y reductasas presentes en las BAL permiten metabolizar los ácidos hidroxycinámicos a alcoholes fenólicos con potente actividad antioxidante (Rodríguez y col., 2009).

Los cambios en la composición fenólica producidos durante la fermentación como consecuencia de la actividad enzimática microbiana mejoran las propiedades antioxidantes de los productos fermentados, como ha sido demostrado en la fermentación de diversas leguminosas con distintos cultivos iniciadores como hongos (*Aspergillus* y *Rhizopus*) y bacterias (*B. subtilis*, *L. plantarum* y *E. faecium*) (Fernández-Orozco y col., 2007, 2008, 2009; Hubert y col., 2008). Así mismo, la bioconversión de compuestos fenólicos mediante fermentación puede mejorar otras propiedades biológicas como la actividad inhibidora de la enzima  $\alpha$ -amilasa, importante para el control de la diabetes (Rhandir y Shetty, 2007). Además, se ha descrito que el aumento de isoflavonas agliconas en la soja como consecuencia de la fermentación con *L. plantarum* o *L. paracasei* previene la pérdida de mineralización ósea asociada a la disminución de niveles de estrógeno en ratones ovariectomizados (Chiang y col., 2011).

En la última década, diversos estudios han revelado que la fermentación de leguminosas puede conducir a una acumulación de GABA. El aumento en la síntesis de GABA durante la fermentación puede atribuirse a la existencia de la enzima glutamato descarboxilasa (GD), enzima que cataliza la descarboxilación del ácido L-glutámico a GABA, ya sea en las leguminosas como en los microorganismos responsables del proceso fermentativo. Varios trabajos han mostrado la presencia de genes que codifican para la enzima GD en diversos géneros de BAL, como *L. plantarum*, *L. paracasei* y *L. brevis* (Komatsuzaki y col., 2005; Di Cagno y col., 2010; Tung y col., 2011; Binh y col., 2014), por lo que las BAL son productores potenciales de GABA. Recientemente se ha descrito el aumento de los niveles de GABA durante la fermentación de judías adzuki (*Vigna angularis*) con un cultivo iniciador mixto de *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus rhamnosus* (Liao y col., 2013). De este modo, la fermentación de leguminosas con BAL

podría constituir una estrategia valiosa para promover la acumulación de este compuesto bioactivo.

De lo expuesto hasta el momento se desprende que la fermentación puede modificar el contenido en compuestos bioactivos dependiendo de la leguminosa utilizada y de las condiciones fermentativas empleadas y puede constituir una herramienta valiosa en la producción de ingredientes y alimentos funcionales con propiedades biológicas definidas, como las antihipertensivas objeto de la presente Memoria.

---

## INTERÉS Y OBJETIVOS

---



### 3. Interés y objetivos

La hipertensión es un problema de salud pública a nivel mundial que afecta aproximadamente a un tercio de la población adulta global. Esta patología causa un deterioro de la calidad de vida de las personas que la padecen y supone una importante carga económica para el sistema sanitario público en todo el mundo. La terapia farmacológica, aunque eficaz para la reducción de la presión sanguínea, ocasiona múltiples efectos secundarios adversos. La búsqueda de alternativas de origen natural para el tratamiento y prevención de la hipertensión está impulsando la investigación y el desarrollo de ingredientes y alimentos funcionales con propiedades antihipertensivas. Las judías y las lentejas tienen gran importancia económica, representando el 35% de la producción mundial de leguminosas grano, así como un elevado contenido de compuestos bioactivos a los que se les atribuyen propiedades beneficiosas en la regulación de la presión arterial. Los procesos de germinación y fermentación pueden contribuir a mejorar estas propiedades saludables de las leguminosas. Por ello, el desarrollo de alimentos e ingredientes funcionales con propiedades antihipertensivas a partir de semillas germinadas y fermentadas es de gran interés no sólo en los ámbitos científico e industrial, sino también para el consumidor, cada vez más concienciado de la relación entre la dieta y la salud.

En base a lo expuesto, la **hipótesis de partida** del presente trabajo es que los procesos de germinación en combinación con el uso de elicitores y de fermentación en estados sólido y líquido podrían ser efectivos para modificar la composición de compuestos con reconocidas propiedades antioxidantes y antihipertensivas en leguminosas y, por tanto, permitirían obtener alimentos e ingredientes con propiedades saludables.

A partir de esta hipótesis, el **objetivo general** del presente trabajo de investigación fue el desarrollo de alimentos e ingredientes con potenciales propiedades antihipertensivas a partir de lentejas castellanas (*Lens culinaris* L. var. castellana) y judías pintas (*Phaseolus vulgaris* var. pinto) mediante germinación y fermentación, dos procesos tecnológicos económicos, sostenibles y respetuosos con el medio ambiente. Para la

consecución de este objetivo general, se han planteado los siguientes **objetivos específicos**:

- 1 Estudiar la eficacia de diferentes elicitores (ácido ascórbico, ácido fólico, ácido glutámico y quitosanos) para mejorar el contenido de compuestos con potencial actividad antihipertensiva en germinados de judías pintas.
- 2 Evaluar el efecto del empleo de elicitores durante la germinación de judías pintas en la composición y actividades antioxidante e inhibidora de la ECA de la fracción de compuestos fenólicos libres.
- 3 Investigar la viabilidad de los procesos de fermentación en estado sólido y líquido para maximizar el contenido de compuestos con potenciales propiedades antihipertensivas en lenteja castellana y judía pinta.

Este trabajo de investigación contribuye a la revalorización de dos leguminosas, lentejas y judías, que hasta el momento han sido industrialmente infravaloradas. Se demuestra, además, el empleo eficaz de dos procesos tecnológicos para el desarrollo de ingredientes y alimentos funcionales de gran aplicabilidad en el sector industrial que pueden contribuir en el control de la presión sanguínea.



---

## RESULTADOS

---



## 4. Resultados

En esta sección se exponen los resultados obtenidos durante la presente Tesis Doctoral en base a los objetivos propuestos. Estos resultados se han recogido en 4 trabajos de investigación publicados en revistas científicas incluidas en el Science Citation Index (SCI).

### **4.1 Efectividad del tratamiento con elicitores para mejorar la composición de fitoquímicos y la potencial actividad antihipertensiva de germinados de judía (*P. vulgaris* var. pinto).**

Como se ha descrito anteriormente, los polifenoles y el GABA son compuestos con reconocidas propiedades antioxidantes, inhibidoras de la ECA y vasodilatadoras. El desarrollo de alimentos ricos en estos compuestos podría ser útil para reducir la incidencia de la hipertensión. La germinación es una estrategia efectiva para mejorar el valor nutricional, la composición de fitoquímicos y bioactividad de semillas de cereales, leguminosas y crucíferas (Fernández-Orozco y col., 2007; Donkor y col., 2012; Nelson y col., 2013). Por otro lado, el uso de elicitores durante la germinación permite potenciar los efectos positivos de este proceso sobre el perfil fitoquímico y la actividad biológica de los germinados (Baenas y col., 2014; Swieca y col., 2014a,b). Hasta el momento, sólo unos pocos trabajos científicos se han centrado en leguminosas (lenteja, soja, guisante y haba) y muestran que la aplicación individual o combinada de elicitores (ácido fólico, ascórbico, quitosanos, radiación UV-B, estrés térmico) y de precursores de la biosíntesis de polifenoles (fenilalanina y tirosina) aumenta los compuestos fenólicos y flavonoides totales y la actividad antioxidante de dichos germinados (Burguieres y col., 2007; Randhir y Shetty, 2007; Swieca y col., 2014a,b). La inducción de respuestas de estrés mediante hipoxia o elevadas concentraciones de NaCl o CaCl<sub>2</sub>, así como el tratamiento con precursores de la biosíntesis de GABA (ácido glutámico, arginina y pyridoxal fosfato) se han utilizado en soja para obtener germinados ricos en este aminoácido no proteico (Guo y col., 2012; Yang y col., 2013). En estos estudios resulta difícil identificar de forma general condiciones óptimas de germinación en presencia de elicitores o precursores ya que la respuesta está determinada por la genética de la planta, las condiciones

ambientales (temperatura, humedad, iluminación, tiempo) (Koehler y col., 2007; Swieca y col., 2012), tipo de elicitor/precursor, dosis e intervalos de tratamiento (Baenas y col., 2014). Por otro lado, los trabajos anteriores están enfocados a un grupo de compuestos. Dado que la etiología de la hipertensión es multifactorial, consideramos interesante obtener germinados enriquecidos en polifenoles y GABA que pudiesen actuar sobre distintas dianas (estrés oxidativo, SRAA y receptores GABAérgicos). La judía es la leguminosa de mayor consumo a nivel mundial (Broughton y col., 2003) en la que no se había investigado, hasta el momento, enriquecer su contenido en compuestos bioactivos y mejorar las actividades antioxidante e inhibidora de la ECA mediante la aplicación de elicitores durante la germinación. Por tanto, nos planteamos centrar nuestro estudio en esta leguminosa. Con el objetivo de maximizar el contenido de compuestos con actividades antihipertensiva en germinados de judía creímos necesario hacer un estudio comparativo de varios elicitores en condiciones de germinación controladas. Para este estudio, elegimos compuestos inductores del metabolismo de polifenoles (ácido ascórbico, fólico y quitosanos), y precursores de la biosíntesis de GABA (ácido glutámico y ácido glutámico con quitosanos) para estimular su biosíntesis y acumulación en los germinados de judía pinta (Publicación I). Para ampliar nuestro conocimiento, se seleccionaron los tratamientos más efectivos y se llevó a cabo la identificación y cuantificación individual de los compuestos fenólicos en los germinados de judía y se investigó cómo afectaban estos cambios a la bioactividad de la fracción fenólica (Publicación II).

A continuación se presentan los resultados de este estudio en forma de dos publicaciones:

**Publicación I.** El papel de los elicitores en las propiedades promotoras de la salud de germinados de judía.

**Publicación II.** Efecto de la germinación y el uso de elicitores en la composición fenólica y bioactividad de judías.

## **Publicación I. El papel de los elicitores en las propiedades promotoras de la salud de germinados de judía.**

Rocio I. Limón, Elena Peñas, Cristina Martínez-Villaluenga, Juana Frias. Role of elicitation on the health promoting properties of kidney bean sprouts. *LWT-Food Science and Technology*, **2014**, 56:328-334.

### **RESUMEN**

El objetivo fue realizar un estudio comparativo sobre la efectividad de diferentes elicitores (ácido ascórbico, fólico, glutámico, ácido glutámico+quitosano y quitosano) para aumentar el contenido de polifenoles totales, GABA y las actividades antioxidante e inhibidora de la ECA en germinados de judía de 4, 6 y 8 días obtenidos a 20°C en oscuridad y 95% de humedad relativa. El efecto de los elicitores en el contenido de polifenoles y GABA de los germinados fue dependiente del tiempo de germinación y del tipo de tratamiento. La aplicación de soluciones de ácido glutámico 5 mM durante 8 días resultó en una mayor acumulación de polifenoles totales (6,06 mg de ácido gálico equivalentes/g de peso seco) y GABA (0,95 mg/g de peso seco). La actividad antioxidante de los germinados de judía tratados con los distintos elicitores disminuyó ligeramente con respecto al control, independientemente del tiempo de germinación ( $P \leq 0,05$ ). Por el contrario, el efecto de los elicitores en la actividad inhibidora de la ECA varió dependiendo del tiempo y del tipo de tratamiento. Cabe destacar que la actividad inhibidora de la ECA de los germinados de 8 días tratados con ácido glutámico ( $IC_{50} = 16 \text{ mg/mL}$ ) fue superior al control ( $P \leq 0,05$ ) y esta actividad aumentó 89 veces después de una digestión gastrointestinal simulada ( $IC_{50} = 0,18 \text{ mg/mL}$ ). Estos resultados contribuyen no sólo a mejorar las propiedades saludables de los germinados de judía, sino también a su potencial aplicación como ingredientes en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales o nutraceuticos.





Contents lists available at ScienceDirect

## LWT - Food Science and Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/lwt](http://www.elsevier.com/locate/lwt)

# Role of elicitation on the health-promoting properties of kidney bean sprouts



Rocio I. Limón, Elena Peñas, Cristina Martínez-Villaluenga, Juana Frias\*

Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 July 2013

Received in revised form

27 November 2013

Accepted 10 December 2013

## Keywords:

Kidney beans

Germination

ACE inhibition

Antioxidant capacity

 $\gamma$ -aminobutyric acid

Soluble phenolic compounds

## ABSTRACT

The influence of germination of kidney beans for 4, 6 and 8 days in different elicitors (ascorbic acid, folic acid, glutamic acid, glutamic acid/chitosan and lactic acid/chitosan) on the production of health-promoting ingredients was studied. Sprouts were characterized according to their protein profile, soluble phenolic compounds (SPC) and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) content. Additionally, the antioxidant and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition activities of aqueous extracts from kidney bean elicited sprouts were determined. Elicitation by glutamic acid for 8 days led to the highest SPC and GABA accumulation in kidney bean sprouts and their extracts were selected based on their highest phytochemical content. These extracts also showed remarkable antioxidant and ACE-inhibitory activities. The  $IC_{50}$  for ACE inhibition of glutamic acid-extracts increases 89-fold after the *in-vitro* gastrointestinal digestion. These results will contribute not only to improving the health-promoting potential of kidney bean sprouts but also to obtaining ingredients which might reduce oxidative stress and hypertension.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Legumes have an excellent nutritional profile and provide phytochemicals that are involved in cardiometabolic risk prevention (Bouchenak & Lamri-Senhadji, 2013). A recent evidence has suggested that complex mixture of bioactives compounds in foods may be more healthful than individual isolated components (Liu, 2004).

Germination is an effective technology that involves physiological changes that improve the digestibility and nutritive value of legumes (Urbano et al., 2005). Germination of legumes has been shown to be a successful strategy to increase the content of antioxidant compounds (Fernandez-Orozco et al., 2008) such as phenolic compounds that present free-radical scavenging activity and therefore can exert cardiovascular protective effects (Andriantsitohaina et al., 2012).  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) also increases during seed germination (Oh, 2003) and it contributes to a reduction in high blood pressure (Hayakawa et al., 2004). In addition, the release of bioactive peptides with ACE-inhibitory activity may also occur during seed germination mitigating the risk of CVD (Bamdad, Dokhani, Keramat, & Zareie, 2009). Thus, germinated legumes could constitute an excellent food choice for the prevention of CVD.

Several authors have applied exogenous elicitors during germination of seeds to stimulate seedling vigor and, in response, the biosynthesis of bioactive compounds, thereby contributing to a significant step toward disease prevention. Burguières, McCue, Kwon, and Shetty (2007) found that the addition of vitamin C and folic acid during pea germination stimulated pea seedling vigor and increase its phenolic content and antioxidant activity. Similarly, soybean seeds soaked in chitosan solutions presented high sprout growth (Lee, Kim, & Kim, 2005). Moreover, glutamic and lactic acids solutions alone or combined with chitosan enhanced the synthesis of GABA in brown rice sprouts (Oh, 2003).

Production of kidney beans is receiving a great attention as a sustainable agriculture crop throughout Europe. Germination is a current strategy to diversify the kidney bean market and the production of sprouts with bioactive compounds enhancement by elicitation will provide health benefits. However, to our knowledge, there is no information about the effect of elicitors during kidney bean germination and resulting health-promoting properties.

Therefore, the primary goal of this research was to evaluate the effectiveness of different elicitors on the sprout growth, proteolysis, soluble phenolic compounds and GABA. The second goal of this study was to evaluate the antioxidant and ACE-inhibitory activity of aqueous extracts from kidney bean elicited sprouts. Finally, those extracts with higher phytochemical content and bioactive properties were submitted to simulated gastrointestinal digestion to assess the effect of *in-vitro* digestion on ACE-inhibitory activity. Results from this study will contribute to support the health-

\* Corresponding author. Tel.: +34 912587510; fax: +34 915644873.  
E-mail address: [frias@ictan.csic.es](mailto:frias@ictan.csic.es) (J. Frias).



promoting potential of kidney bean sprouts and also to obtain functional ingredients from this legume.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Seeds

Light speckled kidney beans (*Phaseolus vulgaris* var. Pinto) were provided by Semillas Iglesias S. A. (Salamanca, Spain). Seeds were stored in polyethylene containers at 4 °C.

### 2.2. Elicitors and treatment of sprouts

Elicitor solutions and their concentration were selected according to previous studies (Burguieres et al., 2007; Oh, 2003). Elicitors were dissolved in distilled water at the following concentrations: 500 µmol/L ascorbic acid; 50 µmol/L folic acid; 5 mmol/L glutamic acid; 50 mg/L low-molecular weight (LMW) chitosan in 5 mmol/L glutamic acid; 50 mg/L LMW chitosan in 5 mmol/L lactic acid. Elicitors were provided by Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). All solutions were freshly prepared before each daily application.

### 2.3. Germination of seeds

50 g of seeds were soaked in 0.07% sodium hypochlorite solution (1:6 w/v) for 30 min at room temperature. Then, seeds were drained and washed with distilled water until they reached a neutral pH. Afterward, seeds were soaked in distilled water (1:6 w/v) for an additional 5.5 h and shaken every 30 min. Finally, hydrated seeds were placed in trays where a wet filter paper was extended, and were then covered. The trays were introduced into a pilot scale germinator G-120 model (ASL Snijders International S.L., The Netherlands) and filter paper was watered daily with the different elicitor solutions. Seeds were maintained wet by capillarity. Germination was performed in the darkness for 4, 6 and 8 days at 20 °C. A negative control experiment of kidney seeds germinated in distilled water was also performed. Every germination experiment was performed in triplicate. The germination percentage was determined based on the total number of seedlings that fully emerged. Sprouts were freeze-dried, milled, packed in vacuum bags and stored at –20 °C.

### 2.4. Chemical analysis of kidney bean sprouts

#### 2.4.1. Total protein determination

Nitrogen content was analyzed by the Kjeldahl method, as described in the AOAC (1992) method 992.15, using a nitrogen analyzer (LECO Corp., St. Joseph, MI). A factor of 6.25 was used for protein content conversion.

#### 2.4.2. SDS-PAGE protein profile

The protein profile of germinated kidney beans was analyzed by SDS-PAGE. Freeze-dried kidney bean sprouts were suspended in a sample buffer (containing 0.125 mol/L TRIS–HCl pH 6.8, 3.75 mL/100 mL glycerol, 1 g/100 mL SDS and 5 mL/100 mL β-mercaptoethanol) diluted in water (1:1, v:v) at a final concentration of 5 mg/mL. 10 µL of each sample were loaded in a gel having the following composition:

*Gradient running gel:* 9–19 g/100 mL acrylamide, 0.08–0.17 g/100 mL bis-acrylamide, 0.36 mol/L TRIS–HCl pH 8.8, 35 mL/100 mL glycerol, 0.1 g/100 mL SDS, 0.02 g/100 mL ammonium persulfate and 0.15 mL/100 mL N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED).

*Stacking gel:* 3.5 g/100 mL acrylamide, 0.09 g/100 mL bis-acrylamide, 0.125 mol/L TRIS–HCl pH 6.8, 0.1 g/100 mL SDS, 0.02 g/100 mL ammonium persulfate, and 0.15 mL/100 mL TEMED.

*Running buffer:* 25 mmol/L TRIS, 0.19 mol/L glycine and 0.1 g/100 mL SDS, pH 8.8.

Gels were dyed with Coomassie Brilliant Blue G-250. A pre-stained molecular weight marker solution (broad range, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was used.

#### 2.4.3. Soluble phenolic compounds

The content of soluble phenolic compounds (SPC) was determined following the protocol of Singleton, Orthofer, and Lamuela-Raventos (1999), adapted to a microplate reader, after their extraction in water adjusted to pH 8 with 0.1 mol/L NaOH. Results were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE)/g of freeze-dried sprout.

#### 2.4.4. GABA content

The quantification of GABA in kidney bean sprouts was performed using a high-performance liquid chromatography (HPLC) as described in Torino et al. (2013).

### 2.5. Preparation of water-soluble extracts

Soluble extracts from kidney bean sprouts were obtained at pH 8 by suspending 2 g of freeze-dried sample in 20 mL of water (adjusted to pH 8.0 with 0.1 mol/L NaOH) and stirring at room temperature for 1 h. The supernatant was collected by centrifugation (15,300×g at 10 °C for 15 min) and subsequent filtration through a Whatman no. 1 filter paper. A single extract was obtained from each germination assay. Finally, soluble extracts were freeze-dried and stored under vacuum at –20 °C until further analysis.

### 2.6. Functional characterization of water-soluble extracts

#### 2.6.1. Soluble protein content

Protein concentration of soluble extracts was determined using the DC Microplate Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) following the manufacturer instructions.

#### 2.6.2. Antioxidant capacity

Oxygen Radical Absorbance Capacity was determined in the germinated kidney bean extracts by fluorescence measurement (ORAC-FL), as recently described by Torino et al. (2013). Results were expressed as mg of Trolox equivalents/g of extract.

#### 2.6.3. ACE-inhibitory activity

ACE-inhibitory peptides are generally short sequences since the active site of ACE cannot accommodate large peptide molecules (Sirtori, Galli, Anderson, & Arnoldi, 2009). Therefore, soluble extracts were ultra-filtrated through a hydrophilic 3 kDa cutoff membrane (Amicon® Ultra-0.5, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). ACE-inhibitory activity of 3-kDa permeates was determined according to Martínez-Villaluenga et al. (2012). IC<sub>50</sub> values, corresponding to the amount of extract that inhibits by 50% the activity of the ACE, were determined by dose–response curves in which the range of concentrations was distributed in a logarithmic scale and calculated using a sigmoidal curve fit function in GraphPad Prism 4.00 software (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA).

#### 2.6.4. In-vitro gastrointestinal digestion

The in-vitro gastrointestinal digestion studies were performed in two different phases:



- a) *In-vitro* gastric digestion (phase 1): 30 mg of freeze-dried extracts were dissolved in 3200  $\mu$ L of simulated gastric fluid (SGF, 0.15 mol/L NaCl, pH 2.5). Then 400  $\mu$ L of a solution containing 0.59 g/100 mL (w/v) porcine pepsin (EC 3.4.23.1) (Sigma–Aldrich) in SGF were added and the pH was adjusted to 2.5 with 0.01 mol/L HCl. Digestion was performed at 37 °C for 2 h and subsequently stopped by increasing the pH to 7.5 with 0.1 mol/L NaOH.
- b) *In-vitro* duodenal digestion (phase 2): For the intestinal digestion step, the pH of the gastric digest was adjusted to 6.5 with 0.01 mol/L HCl. In order to simulate a duodenal environment the following solutions were added: 150.8  $\mu$ L of a bile salt mixture containing equimolar quantities (0.125 mol/L) of sodium taurocholate (Sigma–Aldrich) and glycodeoxycholic acid (Sigma–Aldrich), 46.08  $\mu$ L of 1 mol/L  $\text{CaCl}_2$  (Merck, Darmstadt, Germany), 500  $\mu$ L of 0.25 mol/L Bis–Tris (pH 6.5) (Sigma–Aldrich), and 100  $\mu$ L of pancreatin from porcine pancreas (EC number 232–468–9) (Sigma–Aldrich) in SFG at pH 7.0. Digestion was carried out at 37 °C for 2 h. Finally, pancreatin was inactivated by heating at 80 °C for 15 min.

#### 2.6.5. SDS-PAGE protein profile of digested samples

The NuPAGE® Electrophoresis System was used for the analysis of the digested extracts under non-reducing conditions. Samples were dissolved in sample buffer (4 $\times$  NuPAGE LDS buffer, Invitrogen, CA, USA) at a final protein concentration of 2 mg/mL and they were heated at 70 °C for 10 min. Samples (20  $\mu$ L) were loaded onto a 4–12 g/100 mL polyacrylamide NuPAGE® BisTris pre-cast gel and were run by using the NuPAGE MES-SDS running buffer (Invitrogen) at 150 mV for 1 h. A molecular weight marker solution (NuPAGE mark 12™ solution, Invitrogen) was run in parallel to the samples. Gels were dyed with the Simply Blue safe stain solution (Invitrogen).

#### 2.7. Statistical methods

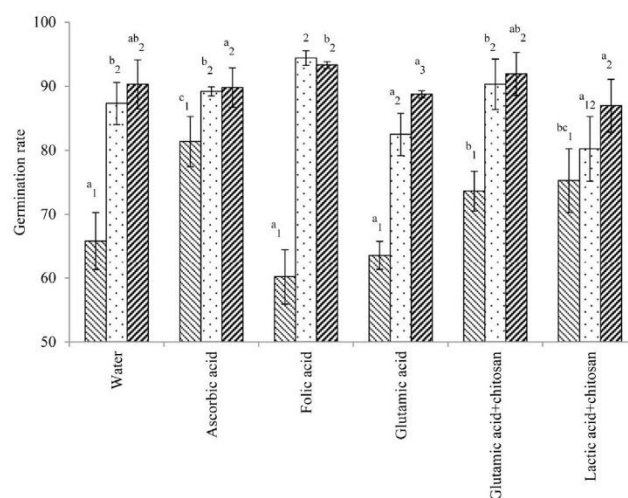
Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation of three independent germination experiments. Three determinations of every experiment were carried out. One-way analysis of variance (ANOVA) using the least significant difference test was conducted to determine differences between samples. Statistical analysis was performed by using Statgraphics 5.0 software (Statistical Graphics Corp, Rockville, MD, USA).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Percentage of germination

Fig. 1 shows the effect of elicitors on germination percentage of kidney bean seeds. Up to the fourth day, the germination percentage reached values between 60% for folic acid and 81% for ascorbic acid. Germination for 6 days led to a noticeable increase in germination rate and values in the range of 80–94%, depending on the elicitor used, were observed. At the eighth day, germination percentages around 90% were achieved, irrespective of the elicitor used.

Folic and ascorbic acids have been suggested as exogenous inducers of seedling growth since they enhance seed vigor and seedling performance (Burguières et al., 2007). Our results showed that ascorbic acid produced the highest level of germination at the fourth day and a slight increase was observed from the fourth to the eighth day. The application of folic and glutamic acids produced the lowest level of germination at the fourth day and no significant ( $P \leq 0.05$ ) differences between both solutions were found. However, the sprouts obtained with folic acid at 6 and 8 days showed



**Fig. 1.** Germination rate of kidney bean seeds in water and in different elicitors solutions. Legend: □ 4 days; ▨ 6 days; ▩ 8 days \*) Data expressed as: (Germinated seeds/total number of seeds)  $\times$  100. In the statistical analysis, the same subscript number between germination times for the same elicitor solution means no significant difference ( $P \leq 0.05$ ); the same superscript letter between elicitors for the same germination time means no significant difference ( $P \leq 0.05$ ).

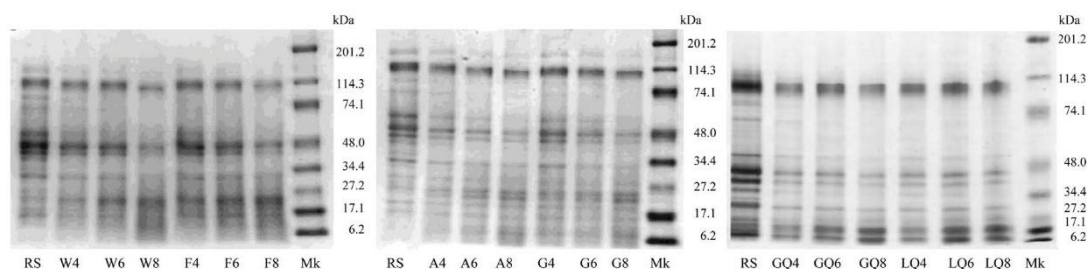
the highest largest germination rates ( $P \leq 0.05$ ), results not observed for glutamic acid. Glutamic acid is usually added during germination to promote GABA synthesis. To our knowledge, there is no information on the effect of glutamic acid on seed germination. In fact, our results show that glutamic-sprouts presented similar germination percentage ( $P \geq 0.05$ ) than those obtained with distilled water. Lee et al. (2005) reported that chitosan stimulates the growth and yield of soybean sprouts. In the present work, chitosan in combination with glutamic or lactic acids also led to a gradual increase of the germination percentage for 6 days, values that did not change significantly ( $P \geq 0.05$ ) up to 8 days (Fig. 1).

#### 3.2. Total protein content and SDS-PAGE profile of kidney bean sprouts

The total protein content increased from 23% d.m. in kidney bean seeds to 26–27% d.m. in kidney bean sprouts, regardless of the assayed elicitor. It is well known that germination increases the total and soluble protein content due to the synthesis of novel peptides. To better understand these changes, SDS-PAGE of germinated kidney beans was studied (Fig. 2). Raw seeds (lane RS) yielded a complex protein pattern characterized by proteins with molecular weight ranging from 6 to 150 kDa. The protein band of  $\sim 115$  kDa likely corresponded to a large protein or to a protein aggregate stabilized by forces other than disulfide bonds (such as hydrogen bonds) since  $\beta$ -mercaptoethanol was unable to disrupt all the disulfide bonds. Two other low-intensity bands (90 and 74 kDa) were observed in RS, but it was not possible to identify them. Other three major bands of about 57, 47 and 45 kDa, were also present and correspond to individual vicilins subunits, as reported by other authors (Rui, Boye, Ribereau, Simpson, & Prasher, 2011; Savelkoul, Tamminga, Leenaars, Schering, & TerMaat, 1994). Another predominant band present in kidney bean seeds (31 kDa) could correspond to phytohemagglutinin, a protein largely present in beans with a molecular weight ranging from 27 to 37 kDa, results that are in agreement with those reported recently in kidney beans var. Pinto (Rui et al., 2011).

Fig. 2 also illustrates the changes in protein profile during kidney bean germination in the presence of different elicitors. The





**Fig. 2.** SDS-PAGE profiles of kidney beans germinated in water and in different elicitors solutions. RS: Raw kidney bean seeds; W4, 6, 8: Kidney bean germinated in water for 4, 6 or 8 days; F4, 6, 8: Kidney bean germinated in folic acid for 4, 6 or 8 days; G4, 6, 8: Kidney bean germinated in glutamic acid for 4, 6 or 8 days; GQ4, 6, 8: Kidney bean germinated in glutamic acid/chitosan for 4, 6 or 8 days; LQ4, 6, 8: Kidney bean germinated in lactic acid/chitosan for 4, 6 or 8 days; Mk: Pre-stained molecular weight marker.

germination process led to a gradual hydrolysis of kidney bean proteins, which was reflected in the disappearance or loss of density of some protein bands, together with the appearance of a smear of lower molecular weight polypeptides in most of the extracts.

The hydrolysis was particularly evident after 8 days of germination, regardless of the elicitor used. Water-germination (lanes W4–8) caused a significant hydrolysis of bands of about 90 and 74 kDa that were almost hydrolyzed after 8 days (lane W8). The density of bands corresponding to vicilin subunits and hemagglutinin (lectin) was gradually reduced during germination. Addition of folic acid (lanes F4–8), ascorbic acid (lanes A4–8), glutamic acid (lanes G4–8), glutamic acid/chitosan (lanes GQ4–8) and lactic acid/chitosan (lanes LQ4–8) did not affect the proteolysis pattern during germination. Germination is a catabolic process characterized by an extensive hydrolysis of seed storage proteins (Urbano et al., 2005). Our results are in agreement with those found by Savelkoul et al. (1994), who observed the degradation of lectin and phaseolin during germination of kidney beans up to 10 days.

### 3.3. Content of soluble phenolic compounds (SPC) in kidney bean sprouts

*P. vulgaris* can be considered a good source of polyphenols, compounds related to antioxidant and antihypertensive activity of plant-based foods (Shahidi & Naczk, 2004). Table 1 shows the content of SPC in kidney bean sprouts produced with different elicitor solutions. The germination for 6 days with folic and glutamic acids led to bean sprouts with similar SPC content to water-sprouts; these were significantly higher ( $P \leq 0.05$ ) than those observed with ascorbic acid, glutamic acid/chitosan and lactic acid/chitosan. At the end of the germination, beans treated with glutamic acid showed the highest SPC content (6.0 mg/g sprout d.m.), followed by folic acid (5.7 mg/g d.m.). Phenolic compounds are essential for the physiology, morphology, growth, defense and stress response in plants and they are affected by many factors such

as growth-regulating substances (Randhir, Shetty, & Shetty, 2002). Our results indicate that the largest increase in SPC content was observed after the application of glutamic acid for 8 days, effect that has not been reported so far. No information has been found on the role of glutamic acid on the biosynthesis of polyphenols during germination. The present results suggest that glutamic acid might stimulate the phenylpropanoid pathway triggering the accumulation of phenolic compounds in kidney bean sprouts.

Ascorbic and folic acids have been applied as exogenous antioxidant elicitors to enhance the phenolic content in pea sprouts due to their inherent antioxidant potential (Burguires et al., 2007). Our results show that folic acid increased SPC content only after 8 days compared to control, results in agreement with those of Burguires et al. (2007). Shetty and Wahlqvist (2004) suggested that folic acid could potentially serve as indirect stimulator for proline biosynthesis, linked to the pentose phosphate pathway activity during stress, which itself is the source of phenolic synthesis precursors.

### 3.4. GABA content in sprouts

The GABA content of beans germinated with different elicitor solutions is collected in Table 1. The addition of ascorbic acid and glutamic acid + chitosan during germination for 4 days led to higher GABA content than that observed in water, while significantly ( $P \geq 0.05$ ) similar amounts were found between folic and glutamic acids and water. After 6 days, germination with water produced slight, but significant ( $P \leq 0.05$ ) differences than those observed with ascorbic and glutamic acids and glutamic acid + chitosan solutions. In contrast, at the end of the germination period the highest GABA concentration was found when glutamic acid solution was applied (0.95 mg/g d.m.), whilst the rest of elicitors led to lower GABA accumulation than water. As it is well known, glutamic acid acts as substrate of glutamate decarboxylase (GAD) for producing GABA during germination. Oh (2003) and Oh and Oh (2003) observed an enhancement in GABA levels in

**Table 1**

Content of soluble phenolic compounds (SPC) and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in kidney beans germinated with water and different elicitor solutions and water for 4, 6 and 8 days.

Germination solutions	SPC (mg GAE/g)			GABA (mg/g)		
	4 days	6 days	8 days	4 days	6 days	8 days
Ascorbic acid	4.24 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	4.43 $\pm$ 0.15 <sup>a,2</sup>	4.81 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.70 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.64 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.65 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
Folic acid	5.43 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>	5.48 $\pm$ 0.34 <sup>b,c</sup>	5.67 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	0.62 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	0.52 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.47 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>
Glutamic acid	5.41 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	5.64 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup>	6.06 $\pm$ 0.46	0.59 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	0.66 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.95 $\pm$ 0.08
Glutamic acid + chitosan	4.21 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	4.77 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	4.91 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	0.65 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.66 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.54 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
Lactic acid + chitosan	4.45 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	4.58 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	4.97 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	0.43 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.48 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.44 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
Distilled water	5.16 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup>	5.27 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup>	5.22 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>	0.57 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.72 $\pm$ 0.02	0.79 $\pm$ 0.01

Results are the mean of three independent experiments  $\pm$  SD. For each compound, the same superscript letter in the same column means no significant difference ( $P \leq 0.05$ ), and the same subscript number in the same row means no significant difference ( $P \leq 0.05$ ).



brown rice germinated for 72 h in glutamic acid and glutamic acid/chitosan. However, results presented here showed an increase in GABA content with glutamic acid solution only after 8 days of germination.

The potential antihypertensive effect of GABA in mammals is well known and GABA-enriched products have been found to lower the blood pressure in spontaneously hypertensive rats (Hayakawa et al., 2004). In addition, brown rice extracts enriched in GABA stimulate immune cells by the production of  $\gamma$ -interferon and interleukin 4 in mice (Oh & Oh, 2003).

### 3.5. Effect of pH on the content of proteins, peptides and phenolic compounds of extracts from kidney bean sprouts

To obtain water-soluble extracts enriched in proteins and peptides, protein solubility was measured at different pH values. Results are shown in Fig. 3. Proteins showed the highest solubility at pH 8–12, which led to recoveries ~90% of the total protein content. No remarkable differences were observed in the protein solubility at pH values from 8 to 12.

Polyphenols solubility is also pH-dependent. Therefore, their extractability at different pH was assayed to enrich bean extracts in these compounds. The largest amount of SPC was extracted at basic pH value (Fig. 3). The increase in SPC concentration at pH in the range 8–12 could be attributable to the alkaline hydrolysis of some insoluble phenolic compounds, as has been previously reported in germinated brown rice by Tian, Nakamura, and Kayahara (2004).

Our results confirm that pH 8 enhances the solubility of protein, peptides and SPC. Consequently, water at pH 8 was used as solvent to prepare bean extracts in which antioxidant and ACE-inhibitory activity was evaluated.

### 3.6. Antioxidant activity of extracts from kidney bean sprouts

Elicitor solutions used in the present study did not improve the antioxidant activity, measured by ORAC-FL assay, compared to the control during the germination period. The antioxidant activity of extracts was affected in a different manner by the solutions applied and germination time. Extracts from 4-day sprouts elicited with ascorbic, folic and glutamic acids presented higher antioxidant activity ( $P \leq 0.05$ ) than glutamic/chitosan and lactic acid/chitosan extracts. Similarly, antioxidant activity of extracts from 6-day sprouts treated with ascorbic and folic acids was higher compared to other elicitors studied. At the end of the germination period, the antioxidant activity remained almost constant

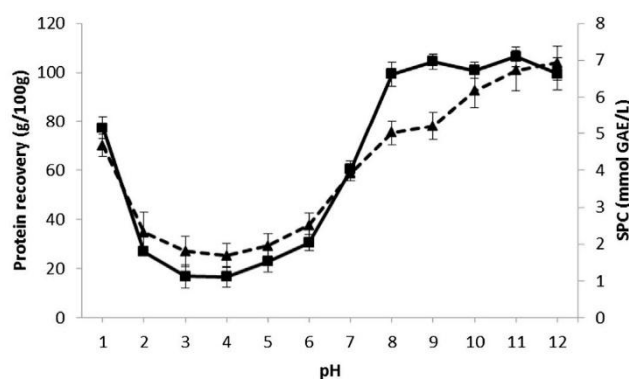


Fig. 3. Protein and soluble phenolic compounds (SPC) extracted from kidney beans at different pH values. —■— % Protein recovery; - -▲- SPC concentration.

Table 2

Antioxidant activity ( $\mu\text{mol TE/g}$  extract) in water-soluble extracts of kidney beans germinated with water and different elicitors solutions for 4, 6 and 8 days.

Germination solutions	4 days	6 days	8 days
Ascorbic acid	55.54 $\pm$ 3.54 <sup>b</sup>	54.61 $\pm$ 4.15 <sup>bc</sup>	53.72 $\pm$ 1.20 <sup>b</sup>
Folic acid	54.40 $\pm$ 3.26 <sup>b</sup>	56.78 $\pm$ 3.16 <sup>b</sup>	48.64 $\pm$ 2.90 <sup>a</sup>
Glutamic acid	56.47 $\pm$ 2.50 <sup>b</sup>	47.73 $\pm$ 3.80 <sup>a</sup>	50.80 $\pm$ 4.11 <sup>ab</sup>
Glutamic acid + chitosan	49.75 $\pm$ 1.63 <sup>a</sup>	49.92 $\pm$ 3.23 <sup>ab</sup>	50.64 $\pm$ 2.02 <sup>ab</sup>
Lactic acid + chitosan	48.59 $\pm$ 2.67 <sup>a</sup>	48.94 $\pm$ 2.23 <sup>a</sup>	50.39 $\pm$ 1.22 <sup>ab</sup>
Distilled water	62.27 $\pm$ 2.68 <sup>a</sup>	62.29 $\pm$ 3.19 <sup>a</sup>	58.63 $\pm$ 4.13

Results are shown in mg Trolox/g extract and are the mean of three independent experiments  $\pm$  SD.

The same superscript letter in the same column means no significant difference ( $P \leq 0.05$ ).

The same subscript number in the same row means no significant difference ( $P \leq 0.05$ ).

( $P \geq 0.05$ ) except for folic acid treatment that was reduced significantly ( $P \leq 0.05$ ) (Table 2).

It is well known that phenolic compounds display peroxy-scavenging activity and, therefore, they can contribute to the antioxidant activity of legume sprouts (Burguières et al., 2007). The concentration of phenolic compounds was influenced by the type of elicitor; however, SPC content in sprouts was not significantly correlated with the antioxidant activity of extracts. Differences in the antioxidant activity of bean extracts could be due to different phenolic composition. The number of hydroxyl groups and the hydroxylation pattern has been linked to polyphenol antioxidant activity (Kim & Lee, 2004). In addition, Burguières et al. (2007) and Randhir et al. (2002) suggested that some polyphenols do not act as antioxidants since some of them are involved in lignification and structural development during seedling growth.

### 3.7. ACE-inhibitory activity of extracts from kidney bean sprouts

Table 3 shows the ACE-inhibitory activity of 3 kDa fraction obtained from germinated bean extracts. Large ACE-inhibition activity was observed in all the sprout extracts, irrespective of the germination treatment applied (85–91% inhibition). Our results after 4 days of germination match with those found by Bamdad et al. (2009) in lentil sprouts who reported 80–85% after 3–5 days of germination. The results indicate that ACE-inhibitory activity suffered slight changes during germination, but we can consider that, in general, the application of elicitor solutions during germination did not affect the ACE-inhibitory activity. To our knowledge, this is the first time that ACE-inhibitory activity has been determined in sprouting legume extracts enriched in proteins and polyphenols. These results suggest that the soluble bean-sprout extracts could provide advantageous health-promoting properties.

Table 3

ACE activity inhibition (%) in soluble extracts of kidney beans germinated with water and different elicitors solutions for 4, 6 and 8 days.

Germination solutions	4 days	6 days	8 days
Ascorbic acid	88.40 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	88.17 $\pm$ 1.39 <sup>ab</sup>	87.44 $\pm$ 1.67 <sup>b</sup>
Folic acid	89.82 $\pm$ 0.45 <sup>bc</sup>	89.91 $\pm$ 0.67 <sup>b</sup>	89.24 $\pm$ 1.49 <sup>bc</sup>
Glutamic acid	88.56 $\pm$ 1.16 <sup>ab</sup>	89.65 $\pm$ 1.54 <sup>bc</sup>	88.53 $\pm$ 1.07 <sup>bc</sup>
Glutamic acid + chitosan	88.50 $\pm$ 1.63 <sup>ab</sup>	90.41 $\pm$ 1.40 <sup>b</sup>	89.65 $\pm$ 1.06 <sup>b</sup>
Lactic acid + chitosan	87.73 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>	86.53 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>	89.35 $\pm$ 1.24 <sup>bc</sup>
Distilled water	91.09 $\pm$ 0.48 <sup>c</sup>	87.24 $\pm$ 0.81 <sup>a</sup>	84.72 $\pm$ 2.87 <sup>a</sup>

Results are expressed as the mean of three independent experiments  $\pm$  SD.

The same superscript letter in the same column means no significant difference ( $P \leq 0.05$ ).

The same subscript number in the same row means no significant difference ( $P \leq 0.05$ ).



Previous studies conducted by our group showed that ACE activity was not inhibited by pure GABA solutions (data not shown). Therefore, ACE-inhibitory activity might be attributed to bioactive peptides released during germination, as has been reported for lentils (Bamdad et al., 2009). Two types of cysteine proteases are generally considered to be the major endopeptidases responsible for the degradation of seed storage protein during early seedling growth (Zakharov et al., 2004). As it was shown in Fig. 2, no changes in SDS-PAGE profile of bean sprouts obtained with different elicitors were found, suggesting that elicitor treatment did not affect endopeptidases activity during germination and similar ACE-inhibitory peptides were formed, regardless of the elicitor employed.

### 3.8. Selection of soluble extracts from kidney bean sprouts with potential antioxidant and antihypertensive properties

On the basis of our results, the extract from seeds germinated with glutamic acid for 8 days were selected as potential antihypertensive ingredients based on their higher GABA and SPC contents, as well as their potent antioxidant and ACE-inhibitory activities. Antioxidant activity of this extract was ~50 times higher than that reported by Lopez et al. (2013), who found 0.94  $\mu\text{mol TE/mg}$  of raw dark beans (*P. vulgaris* L. cv. Tolosana). Moreover, ACE-inhibitory activity of selected extracts was similar than that of fermented lentil ingredients (90–92%) recently reported (Torino et al., 2013).

### 3.9. Effect of gastrointestinal digestion of soluble extracts from kidney bean sprouts on their ACE-inhibitory activity

*In-vitro* digestion of bioactive peptides may modify their activity as a consequence of subsequent proteolysis by gastrointestinal

enzymes. To assess the effective ACE-inhibitory activity of extracts from bean sprouts obtained with glutamic acid, they were subjected to a simulated *in-vitro* gastrointestinal digestion. Fig. 4 shows that *in-vitro* digestion led to the hydrolysis of storage proteins and, consequently, peptides lower than 6 kDa were formed.  $\text{IC}_{50}$  value of non-digested sample was 16 mg/mL and after *in-vitro* digestion this value was markedly lower (0.18 mg/mL), which indicates that the ACE-inhibitory potency increased 89-fold. These results suggest that new ACE-inhibitory peptides are released by gastrointestinal proteases, results that are in accordance with those observed by SDS-PAGE (Fig. 4). Antihypertensive peptides generally contain from 2 to 20 amino acid residues (Sirtori et al., 2009) and thus, small peptides present in the 3 kDa permeate after *in-vitro* digestion could be the responsables of the ACE-inhibitory activity observed in glutamic acid-extracts.

## 4. Conclusions

Our results reveal that the application of some elicitors during kidney bean germination can increase the sprouts productivity, proteolysis, SPC and GABA. Moreover, extracts from kidney bean seeds germinated with elicitor solutions also showed high antioxidant and ACE-inhibitory activity. Glutamic acid-extracts presented the lowest ACE  $\text{IC}_{50}$ , value which sharply decreased after simulated gastrointestinal digestion, indicating that ACE-inhibitory potency was 89-fold higher after *in-vitro* digestion. Due to the growing consumer interest for functional foods, the identification of health-promoting ingredients may provide further insights into novel nutraceutical applications for kidney bean sprouts.

## Acknowledgments

This work was supported by the AGL2010-16310 project from the Ministerio de Economía y Competitividad (Spain). R.I.L. thanks to CSIC and FSE-EU for the PhD supporting grant.

## References

- Andriantsitohaina, R., Auger, C., Chataigneau, T., Etienne-Selloum, N., Li, H., Martínez, M. C., et al. (2012). Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *British Journal of Nutrition*, 108, 1532–1549.
- AOAC. (1992). *Method 992.15 crude protein in meat and meat products including pet foods – Combustion met.* AOAC.
- Bamdad, F., Dokhani, Sh, Keramat, J., & Zareie, R. (2009). The impact of germination and *in vitro* digestion on the formation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from lentils proteins compared to whey proteins. *International Journal of Biological and Life Sciences*, 1, 52–62.
- Bouchenak, M., & Lamri-Senhadj, M. (2013). Nutritional quality of legumes, their role in cardiometabolic risk prevention: a review. *Journal of Medicinal Food*, 16, 185–198.
- Burguières, E., McCue, P., Kwon, Y.-I., & Shetty, K. (2007). Effect of vitamin C and folic acid on seed vigour response and phenolic-linked antioxidant activity. *Bioresource Technology*, 98, 1393–1404.
- Fernandez-Orozco, R., Frias, J., Zielinski, H., Piskula, M. K., Kozłowska, H., & Vidal-Valverde, C. (2008). Kinetic study of the antioxidant compounds and antioxidant capacity during germination of *Vigna radiata* cv. emmerald, *Glycine max* cv. jutro and *Glycine max* cv. merit. *Food Chemistry*, 111, 622–630.
- Hayakawa, K., Kimura, M., Kasaha, K., Matsumoto, K., Sansawa, H., & Yamori, Y. (2004). Effect of a gamma-aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *British Journal of Nutrition*, 92, 411–417.
- Kim, D., & Lee, C. Y. (2004). Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 253–273.
- Lee, Y. S., Kim, Y. H., & Kim, S. B. (2005). Changes in the respiration, growth, and vitamin C content of soybean sprouts in response to chitosan of different molecular weights. *HortScience*, 40, 1333–1335.
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 134, 3479S–3485S.
- Lopez, A., El-Naggar, T., Dueñas, M., Ortega, T., Estrella, I., Hernandez, T., et al. (2013). Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 138, 547–555.

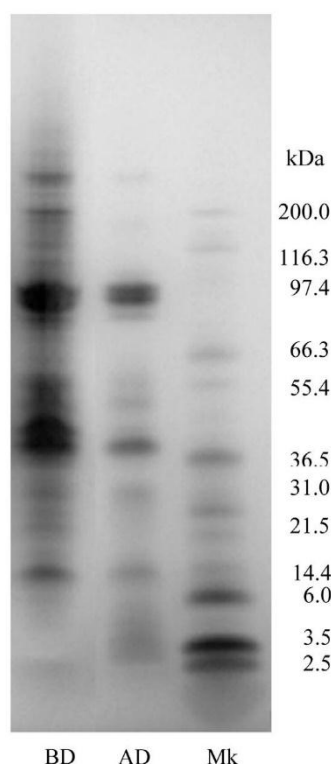


Fig. 4. SDS-PAGE profile of extracts from 8-day sprouted kidney beans obtained in glutamic acid before (BD) and after (AD) *in vitro* gastrointestinal digestion.

- Martínez-Villaluenga, C., Torino, M. I., Martín, V., Arroyo, R., García-Mora, P., Estrella, I., et al. (2012). Multifunctional properties of soymilk fermented by *Enterococcus faecium* strains isolated from raw soymilk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10235–10244.
- Oh, S.-H. (2003). Stimulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid synthesis activity in brown rice by a chitosan/glutamic acid germination solution and calcium/calmodulin. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36, 319–325.
- Oh, S.-H., & Oh, C.-H. (2003). Brown rice extracts with enhanced levels of GABA stimulate immune cells. *Food Science and Biotechnology*, 12, 248–252.
- Randhir, R., Shetty, P., & Shetty, K. (2002). L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry*, 37, 1247–1256.
- Rui, X., Boye, J. I., Ribereau, S., Simpson, B. K., & Prasher, S. O. (2011). Comparative study of the composition and thermal properties of protein isolates prepared from nine *Phaseolus vulgaris* legume varieties. *Food Research International*, 44, 2497–2504.
- Savelkoul, F. H. M. G., Tamminga, S., Leenaars, P. P. A. M., Schering, J., & TerMaat, D. W. (1994). The degradation of lectins, phaseolin and trypsin inhibitors during germination of white kidney beans, *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Foods for Human Nutrition*, 45, 213–222.
- Shahidi, F., & Naczek, M. (2004). Cereals, legumes and nuts. In F. Shahidi, & M. Naczek (Eds.), *Phenolic in food and nutraceuticals* (pp. 17–83). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Shetty, K., & Wahlqvist, M. (2004). A model for the role of the proline-linked pentose-phosphate pathway in phenolic phytochemical bio-synthesis and mechanism of action for human health and environmental applications. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13, 1–24.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, 299, 152–178.
- Sirtori, C. R., Galli, C., Anderson, J. W., & Arnoldi, A. (2009). Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention: focus on dietary proteins. *Atherosclerosis*, 203, 8–17.
- Tian, S., Nakamura, K., & Kayahara, H. (2004). Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice, and germinated brown rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4808–4813.
- Torino, M. I., Limón, R. I., Martínez-Villaluenga, C., Mäkinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde, C., et al. (2013). Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chemistry*, 136, 1030–1037.
- Urbano, G., Aranda, P., Vilchez, A., Aranda, C., Cabrera, L., Porres, J. M., et al. (2005). Effects of germination on the composition and nutritive value of proteins in *Pisum sativum*, L. *Food Chemistry*, 93, 671–679.
- Zakharov, A., Carchilan, M., Stepurina, T., Rotari, V., Wilson, K., & Vaintraub, I. (2004). A comparative study of the role of the major proteinases of germinated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds in the degradation of their storage proteins. *Journal of Experimental Botany*, 55, 2241–2249.



## **Publicación II. Efecto de la germinación y el uso de elicitores en la composición fenólica y bioactividad de judía.**

Montserrat Dueñas, Cristina Martínez-Villaluenga, Rocío I. Limón, Elena Peñas, Juana Frias. Effect of germination and elicitation on phenolic composition and bioactivity of kidney bean. *Food Research International*, **2015**, 70, 55-63.

### **RESUMEN**

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto de la germinación y el tratamiento con distintos elicitores (ácido ascórbico 500  $\mu$ M, ácido fólico 50  $\mu$ M y ácido glutámico 5 mM) en la composición y actividades antioxidante e inhibidora de la ECA de la fracción de compuestos fenólicos libres de judía germinada durante 8 días. El perfil fenólico de las semillas y los germinados de judía fue analizado mediante LC-ESI-MS. La germinación produjo una disminución general de flavan-3-oles y antocianinas, que fue compensada con el aumento del contenido total de flavanonas y flavonoles. Aunque los tratamientos con elicitores reducían el contenido total de compuestos fenólicos, destacó el aumento significativo de ciertos glucósidos de flavanonas (eriodictiol) y flavonoles (kanferol y quercetina). La aplicación de ácido fólico y ascórbico no modificó significativamente ( $P \geq 0,05$ ) la actividad antioxidante de los extractos fenólicos, mientras que el ácido glutámico redujo ligeramente ( $P \leq 0,05$ ) la actividad antioxidante de los extractos fenólicos. Por otro lado, la aplicación de elicitores durante la germinación mejoró la actividad inhibidora de la ECA con respecto al control ( $P \leq 0,05$ ), siendo el ácido fólico el elicitor más efectivo. En conclusión, el uso de elicitores durante la germinación produjo cambios en el perfil fenólico y la modificación de la fracción fenólica se relacionó con la mejora de la actividad inhibidora de la ECA de los germinados de judía. No obstante, la selección del elicitor es crucial para optimizar la composición fenólica y maximizar la actividad biológica del producto final.







Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodres](http://www.elsevier.com/locate/foodres)

## Effect of germination and elicitation on phenolic composition and bioactivity of kidney beans

Montserrat Dueñas<sup>a</sup>, Cristina Martínez-Villaluenga<sup>b</sup>, Rocio I. Limón<sup>b</sup>, Elena Peñas<sup>b</sup>, Juana Frias<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Grupo de Investigación de Polifenoles, Unidad de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel Unamuno, 37007 Salamanca, Spain

<sup>b</sup> Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 November 2014

Accepted 24 January 2015

Available online 31 January 2015

#### Keywords:

Kidney beans

Germination

Elicitors

Phenolic compounds

Flavonoids

ACE inhibition activity

Antioxidant activity

### ABSTRACT

Ready-to-eat sprouts are becoming popular healthy fresh foods. Germination and elicitation may be used to improve phytochemical and functional quality of sprouts. The aim of this study was to unveil the efficacy of germination and the use of elicitors (500  $\mu$ M ascorbic, 50  $\mu$ M folic and 5 mM glutamic acid) to enhance the phenolic composition and antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of 8 day-old *Phaseolus vulgaris* L. var. Pinto sprouts. Sprouting produced a general decrease in flavan-3-ols and anthocyanins of sprouts that was compensated with a higher content of flavanones and flavonols. Although elicitor treatments reduced total phenolic content of sprouts, they promoted the synthesis of specific flavanones and flavonol O-glycosides, effect that was dependent on the type of elicitor. Antioxidant activity was not affected by ascorbic and folic acid treatments whereas it was slightly reduced in glutamic acid-treated sprouts. Folic acid was the only treatment that caused an outstanding increase in the ACE inhibitory activity of sprouts. In conclusion, elicitation may produce positive changes in the phenolic profile and improve health-promoting potential of sprouts, although selection of elicitor is crucial to deliver marketplace ready to eat sprouts enriched in specific bioactive phytochemicals.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Nowadays, legumes are gaining considerable interest in developed countries because there is a positive association between their consumption and the reduction of the risk of cardiovascular diseases, obesity, diabetes type 2 and cancer (Bouchenak & Lamri-Senhadjji, 2013; Rebello, Greenway, & Finley, 2014; Rondini, Barrett, & Bennink, 2013). Health benefits of legumes are attributed to their nutritional composition. Nutritionally, legumes are rich in protein, carbohydrates, dietary fiber, minerals and vitamins. In addition, legumes also contain a rich variety of phytochemicals, such as phenolic compounds, which are closely associated to beneficial effects in human health (Duranti, 2006). Phenolic compounds are the major antioxidants in legumes that play a key role in limiting the effects of cellular and molecular damages by reducing reactive oxygen species (Thériault, Caillet, Kermasha, & Lacroix, 2006) involved in the development of many diseases and aging. Besides antioxidant activity, in vitro and animal studies have shown that phenolic compounds may exhibit other positive effects such as anti-inflammatory, anti-hypertensive, anti-atherosclerotic and cytotoxic antitumor activities (Del Rio et al., 2013).

Legume sprouts are extensively accepted since they are considered fresh and healthy products from natural origin which provide a source

of bioactive compounds (Donkor, Stojanovska, Ginn, Ashton, & Vasiljevic, 2012). Germination is a cost-effective process that improves the nutritional quality of legumes by increasing protein digestibility and free amino acid content (Alonso, Aguirre, & Marzo, 2000; Gravidel & Prakash, 2007). Legume sprouting has also been suggested as a powerful strategy to increase total antioxidant activity (Fernández-Orozco et al., 2006). However, phenolic content and composition, often related to their antioxidant properties, depend on the type of legume and germination conditions (López-Amorós, Hernández, & Estrella, 2006). There are no reports concerning the influence of elicitation on the protein quality of sprouts. Recent studies have shown that abiotic elicitation of lentils decreases protein content while increasing free amino acids and peptides (Świeca & Baraniak, 2014; Świeca, Baraniak, & Gawlik-Dziki, 2014). Elicitation is a good strategy to induce the synthesis of different classes of bioactive secondary metabolites. Efficacy of this treatment depends mainly on plant genetics, elicitor nature and dose (Baenas, García-Viguera, & Moreno, 2014). Several studies (reviewed by Baenas et al., 2014) have used pre-elicitor treatments to affect the phenolic composition of different sprouts and only few of them have focused on legume seeds (Burguières, McCue, Kwon, & Shetty, 2007; Burguières, McCue, Kwon, & Shetty, 2008; Limón, Peñas, Martínez-Villaluenga, & Frias, 2014; Liu, Cao, Huang, Guo, & Kang, 2013). Burguières et al. (2007) demonstrated that soaking pea seeds for 12–48 h in ascorbic (500  $\mu$ M) and folic (50  $\mu$ M) acid solutions results in increased total phenolic content and

\* Corresponding author. Tel.: +34 912587510; fax: +34 915644853.  
E-mail address: [frias@ictan.csic.es](mailto:frias@ictan.csic.es) (J. Frias).



antioxidant activity in 8-day old sprouts. These changes in the phenolic composition were also related to an increased bioactivity of the phenolic extracts including inhibition of angiotensin I converting enzyme (ACE) and gastrointestinal  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes, which are molecular targets for the management of hypertension and diabetes, respectively (Burguieres et al., 2008). Similarly, Liu et al. (2013) reported that ethylene (100 mg/L) improved total phenolic content and free radical scavenging-linked activity in mung bean sprouts. More recently, our research group found that kidney bean seeds treated with glutamic (5 mM), folic (50  $\mu$ M) or ascorbic (500  $\mu$ M) acid during germination for 8 days showed an enhanced content of total phenolic compounds and  $\gamma$ -aminobutyric acid as well as antioxidant and ACE inhibitory activities (Limón et al., 2014). There is still a knowledge gap concerning the effect of elicitation during kidney bean germination on the concentration of individual phenolic compounds of kidney bean sprouts and how these changes in the phenolic composition affect different bioactivities of the phenolic fraction. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of germination and elicitation of kidney bean seeds on the phenolic composition and the antioxidant and ACE-inhibitory activities of phenolic extracts. This study will bring new insights to fresh produce industry to obtain healthier products by improving phenolic composition with specific active compounds that have functional properties.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Acetonitrile, formic acid and ultrapure water were of HPLC grade from Carlo Erba (Rodano, Italy) and Panreac (Barcelona, Spain). Phenolic compound standards were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and Extrasynthese (Barcelona, Spain). Tripeptide Abz-Gly-Phe(NO<sub>2</sub>)-Pro was purchased from Cymit-Química (Barcelona, Spain). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) unless otherwise specified.

### 2.2. Plant material

Light speckled kidney beans (*Phaseolus vulgaris* var. Pinto) were purchased from Semillas Iglesias S.A. (Salamanca, Spain). Seeds were stored in polyethylene containers at 4 °C and cleaned before germination process.

### 2.3. Elicitor solutions

Elicitor solutions of 500  $\mu$ M ascorbic acid, 50  $\mu$ M folic acid and 5 mM glutamic acid were selected according to previous studies (Limón et al., 2014). Elicitor solutions were freshly prepared before daily application.

### 2.4. Germination conditions

Kidney beans were germinated as described by Limón et al. (2014). Germination was performed at 20 °C, 95% of relative humidity in darkness for 8 days. Seeds were irrigated daily with fresh solutions of elicitors or distilled water (control). Each treatment was performed in triplicate and sprouts were collected at day 8 of germination for analysis. Sprouts were freeze-dried, milled, and stored at –20 °C in vacuum bags until further analysis.

### 2.5. Extraction of phenolic compounds

Freeze-dried samples (5 g) were macerated in methanol:TFA (1<sup>0</sup>/<sub>000</sub>)–water 80:20 (v/v) at 4 °C for 16 h. Subsequently, they were centrifuged at 4000 g and 5 °C for 20 min in a super-speed centrifuge (Sorval RC 5B). The extraction process was repeated twice.

The extracts were combined and concentrated at 30 °C under vacuum for methanol evaporation.

For phenolic analysis, the dry extracts were dissolved in 10 mL of water. For purification, an aliquot (4 mL) was passed through a C18 Sep-Pak cartridge (Waters, Milford, MA, USA), previously activated with methanol followed by water. Sugars and polar substances were removed by passing 10 mL of ultrapure water and phenolic compounds were eluted with methanol. Afterwards, extract was concentrated under vacuum in a rotary evaporator (30 °C) and then dissolved in aqueous 0.1% TFA:acetonitrile (90:10 v/v) for phenolic compound analysis.

### 2.6. HPLC–DAD–ESI/MS<sup>n</sup> qualitative and quantitative analyses of phenolic compounds

#### 2.6.1. Non-anthocyanin compounds

Samples were analyzed using Hewlett-Packard 1100MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) chromatograph equipped with a quaternary pump, diode array detector (DAD) coupled to an HP Chem Station (rev. A.0504) data-processing station. Solvents used were 0.1% formic acid in water (solvent A), and 100% acetonitrile (solvent B). The elution gradient established was 15% B for 5 min, 15–20% B for 5 min, 20–25% B for 10 min, 25–35% B for 10 min, 35–50% B for 10 min, and re-equilibration of the column. The separation of phenolic compounds was performed in a Spherisorb S3 ODS-2 C8 column (Waters, Millford, USA) (3  $\mu$ m, 150 mm  $\times$  4.6 mm i.d.) operating at 35 °C and a flow rate of 0.5 mL min<sup>–1</sup>. Double online detection was carried out in the DAD using 280 nm and 370 nm as preferred wavelengths. Mass spectrometer (MS) connected to the HPLC system via the DAD cell outlet was used and detection was performed in an API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) equipped with an ESI source, triple quadrupole-ion trap mass analyzer and controlled by the Analyst 5.1 software. The setting parameters were: zero grade air as the nebulizer gas (30 psi), turbo gas for solvent drying (400 °C, 40 psi), nitrogen served as the curtain (20 psi) and collision gas (medium). The quadrupoles were set at unit resolution. The ion spray voltage was set at –4500 V in the negative mode. The MS detector was programmed to perform a series of two consecutive modes: enhanced MS (EMS) and enhanced product ion (EPI) analysis. EMS was employed to show full scan spectra, to give an overview of all the ions in sample. Settings used were: declustering potential (DP) –45 V, entrance potential (EP) –6 V, collision energy (CE) –10 V. Spectra were recorded in negative ion mode between m/z 100 and 1000. EPI mode was further performed with the aim to obtain the fragmentation pattern of the parent ion(s) of the previous experiment using the following parameters: DP: –50 V, EP: –6 V, CE: –25 V, and collision energy spread (CES) 0 V.

The non-anthocyanin phenolic compounds were characterized according to their UV and mass spectra and retention times, and comparison with authentic standards when available. For quantitative analysis, calibration curves were prepared by injection of known concentrations of different standard compounds. Aldaric, quinic and hexoside derivatives of *p*-coumaric, ferulic and sinapic acids were quantified by the curves of the corresponding free acids; (+)-catechin-*O*-hexoside and (+)-catechin-*O*-acetylhexoside based on the curve of (+)-catechin; flavonols, derivatives of kaempferol, quercetin and isorhamnetin by the curves of kaempferol-3-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-glucoside and isorhamnetin 3-*O*-rutinoside, respectively. Flavanones, eriodictyol and naringenin derivatives were quantified by the curve of naringenin; and hesperetin derivatives as hesperitin. Results were expressed as  $\mu$ g/g of sprout d.m.

#### 2.6.2. Anthocyanins

Samples were analyzed in an AQUA® HPLC system (Phenomenex) equipped with a reverse phase C18 column (5  $\mu$ m, 150 mm  $\times$  4.6 mm i.d.) at 35 °C according to García-Marino, Hernández-Hierro, Rivas-Gonzalo, and Escribano-Bailón (2010). Detection was carried out at



520 nm. MS was performed in the same equipment described above. Zero grade air served as the nebulizer gas (40 psi) and turbo gas (600 °C) for solvent drying (50 psi). Nitrogen served as the curtain (100 psi) and collision gas (high). Both quadrupole units were set at unit resolution. The ion spray voltage was set at 5000 V in the positive mode. EMS and ESI methods were used for acquisition of full scan spectra and fragmentation patterns of the precursor ions, respectively. Setting parameters used for EMS mode were: declustering potential (DP) 41 V, entrance potential (EP) 7.5 V and collision energy (CE) 10 V. Parameters for EPI mode were: DP 41 V, EP 7.5 V, CE 10 V, and collision energy spread (CES) 0 V. For the quantitative analysis of anthocyanins a calibration curve was obtained by injection of different concentrations of cyanidin 3-*O*-glucoside, malvidin 3-*O*-glucoside and pelargonidin 3-*O*-glucoside. The results were expressed in µg/g of sprout.

### 2.7. Antioxidant activity

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC-FL) was determined by fluorescence in methanolic extracts as described by Torino et al. (2013). Fluorescence was measured at  $\lambda_{exc}$  485 nm and  $\lambda_{emi}$  485 nm every minute for 150 min using a microplate reader (Synergy HT, BioTek Instruments, Inc Vermont, USA). The equipment was controlled by Gen 5™ software (version 1.1.). Trolox was used as standard. Results were expressed as µg Trolox equivalents (TE)/g extract.

### 2.8. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity

ACE inhibitory activity was determined in methanolic extracts according to the method described by Martínez-Villaluenga et al. (2012). IC<sub>50</sub> values (concentration of sample that inhibits 50% of the ACE activity) were determined by dose–response curves in which the range of concentrations was distributed in a logarithmic scale and using a sigmoidal curve fit in GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

### 2.9. Statistical analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation of three independent germination experiments. Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) and significant differences between samples were determined by the least significant differences (LSD) test at  $p \leq 0.05$  probability level, using PASW Statistics 18.0 software (IBM, Armonk, NY, USA). Principal Components Analysis (PCA) was performed with covariance matrix obtained by data transformation using also PASW Statistics 18.0 software.

## 3. Results

### 3.1. Identification of phenolic compounds in kidney bean seeds and sprouts

Identification and quantification of individual phenolic compounds of kidney bean (*P. vulgaris* L. var. Pinto) seeds and sprouts were performed by HPLC–DAD–MS<sup>n</sup> analysis. The retention time,  $\lambda_{max}$ , molecular ion and their fragment ion pattern allowed the identification of 38 phenolic compounds belonging to hydroxybenzoic and hydroxycinnamic, flavan-3-ol, flavanone, flavonol and anthocyanin phenolic classes (Table 1).

#### 3.1.1. Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic compounds

A large group of hydroxycinnamic acid derivatives was identified (Table 1). Nine compounds (peaks 3–6, 8–10, 12 and 17) were detected as aldaric acid (glucaric or galactaric acid) derivatives according to their UV–vis spectra ( $\lambda_{max}$  at 312–328 nm) and precursor ions  $[M - H]^-$  at  $m/z$  355, 385 and 415, all of them with a fragment ion at  $m/z$  209, corresponding to an aldaric acid residue. No information about the

identity of aldaric acid moieties and location onto the acid was obtained; therefore, these compounds were assigned to isomers of *trans*-*p*-coumaroyldaric, *trans*-feruloyldaric and sinapoyldaric acid.

Other compounds were identified as feruloyl hexoside acid and *p*-coumaroyl acetylhexoside acid (peaks 1 and 16) based on their UV–vis spectra with maximum at 328–330 nm, precursor ions  $[M - H]^-$  (at  $m/z$  355 and 367, respectively) and fragment ions at  $m/z$  193 and 163 corresponding to the loss of an hexose unit and acetyl hexoside unit respectively. Three compounds (peaks 18, 24 and 27) showed an UV–vis spectrum similar to ferulic acid with  $\lambda_{max}$  at 326–330 nm, but eluted at different retention times. They presented precursor ions  $[M - H]^-$  at  $m/z$  367 and fragments at  $m/z$  191 and 193, due to the deprotonated quinic acid and [ferulic acid – H]<sup>–</sup>, respectively. *p*-Coumaroyl (peak 15) and sinapoyl acid derivatives (peaks 19 and 21) were also detected by their typical UV–vis spectra and fragments at  $m/z$  163 and 223, ([*p*-coumaric acid – H]<sup>–</sup> and [sinapic acid – H]<sup>–</sup>, respectively). These compounds could not be fully identified. *p*-Hydroxybenzoic (peak 13) and ferulic acids (peak 25) were identified by comparison of their UV–vis spectra and retention times with commercial standards.

#### 3.1.2. Flavan-3-ols

(+)-Catechin (peak 11) was identified by comparison of their UV spectra and retention time with a commercial standard. (+)-Catechin-*O*-hexoside (peak 2) and (+)-catechin-*O*-acetylhexoside (peak 7) were detected on the basis of their UV spectrum similar to (+)-catechin and  $[M - H]^-$  at  $m/z$  451 and 493, respectively. Fragment ions corresponded to the loss of hexosyl and the acetylhexosyl moieties. In none of them the identity of the sugar and location of the substituents could be established.

#### 3.1.3. Flavanones

Peaks 14, 20, 22, 23, and 33 presented a typical UV–vis spectra of flavanones. Peak 20 was identified as eriodictyol-7-*O*-glucoside by comparison with a commercial standard. Peaks 14 and 33 were assigned to eriodictyol-*O*-hexoside and eriodictyol-*O*-acetylhexoside, respectively, according to their  $[M - H]^-$  at 449 and 491, respectively, and fragments corresponding to the losses of hexosyl moieties (–162 *uma*) in peak 14, and the acetylhexoside residue (–162 + 42 *uma*), in peak 33. In none of them the identity of the sugar and location of the substituents could be established. Other detected flavanone was hesperetin-*O*-glucuronyl-hexoside (peak 22) on the basis of their mass spectra with  $[M - H]^-$  at  $m/z$  639, and fragment ion at  $m/z$  301 due to the loss of glucuronyl-hexoside moiety. Peak 23 presented UV–vis spectra similar to naringenin, but it eluted at a different retention time. No clear signal associated to its molecular ion could be obtained, although ion at  $m/z$  271 (possibly naringenin) was observed using ESI detection. Since this compound eluted earlier than the naringenin standard, it was tentatively identified as naringenin derivative.

#### 3.1.4. Flavonols

Quercetin derivatives (peaks 26, 28, 29 and 32) were found in seeds and sprouts, which presented similar UV spectra ( $\lambda_{max}$  at 356 nm) to quercetin. Peak 26 (quercetin 3-*O*-rutinoside) and peak 28 (quercetin 3-*O*-glucoside) were identified according to their retention time, mass and UV–vis characteristics by comparison with commercial standards. Quercetin-*O*-acetylhexoside (peak 29) and quercetin-*O*-hexoside (peak 32) were identified according to  $[M - H]^-$  at  $m/z$  505 and 463, respectively. Fragment ion at  $m/z$  301 corresponded to quercetin. Kaempferol derivatives were also observed according to their UV–vis and mass spectra with fragment ions at  $m/z$  285. Peaks 30 and 31 were identified as kaempferol-3-*O*-rutinoside and kaempferol-3-*O*-glucoside, respectively, by comparison with commercial standards. Isorhamnetin derivative (peak 34) showed a UV–vis spectra with



**Table 1**

Identification of phenolic compounds from kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds by using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with ultraviolet–visible diode array detector (DAD) and mass spectrometry detectors (triple quadrupole ion trap). \*Relative abundance < 2%.

Peak	Rt (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Molecular ion $[M - H]^-$ (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Tentative identification
<i>Non-anthocyanin</i>					
1	4.63	330	355	193*	Feruloyl hexoside acid
2	4.82	278	451	289 (100), 245 (33)	Catechin hexoside
3	5.22	312	355	209 (64), 191 (100), 163 (21)	<i>trans-p</i> -Coumaroyl aldaric acid 1
4	5.81	324	385	209 (24), 193 (21), 191 (100)	<i>trans</i> -Feruloyl aldaric acid 1
5	6.04	316	355	209 (75), 191 (100), 163 (37)	<i>trans-p</i> -Coumaroyl aldaric acid 2
6	6.37	314	385	209 (64), 193 (8), 191 (100)	<i>trans</i> -Feruloyl aldaric acid 2
7	6.53	278	493	451 (12), 289 (100)	Catechin acetylhexoside
8	6.89	326	385	209 (49), 193 (31), 191 (100)	<i>trans</i> -Feruloyl aldaric acid 3
9	7.23	328	385	209 (79), 193 (7), 191 (100)	<i>trans</i> -Feruloyl aldaric acid 4
10	7.58	326	415	223 (16), 209 (45), 191 (100)	Sinapoyl aldaric acid
11	7.90	278	289	245 (67), 205 (40), 151 (26), 137 (21)	(+)-Catechin
12	9.02	320	385	209 (41), 193 (23), 191 (100)	<i>trans</i> -Feruloyl aldaric acid 5
13	9.33	256	137	–	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid
14	10.2	294	449	287 (41)	Eriodictyol- <i>O</i> -hexoside 1
15	10.83	330	387	163 (28)	<i>p</i> -Coumaroyl derivative acid
16	12.03	328	367	163 (100)	<i>p</i> -Coumaroyl acetylhexoside acid
17	13.02	322	415	223 (11)	Sinapoyl aldaric acid
18	13.75	330	367	193 (51), 191 (100), 175 (78), 175 (5)	Feruloyl quinic acid
19	14.30	314	429	223 (100)	Sinapoyl derivative
20	15.30	292, 330sh	449	287 (20)	Eriodictyol-7- <i>O</i> -glucoside
21	15.80	324	429	223 (95)	Sinapoyl derivative
22	16.68	284, 334sh	639	301 (100)	Hesperetin- <i>O</i> -glucuronyl-hexoside
23	17.11	288, 310sh	–	271 (100)	Naringenin derivative
24	18.10	326	367	193 (100), 191 (79), 175 (65), 149 (26), 134 (47)	Feruloyl quinic acid
25	19.22	322	193	149 (6)	Ferulic acid
26	19.3	352	609	301 (3)	Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside
27	19.9	330	367	193 (100), 191 (7), 175 (71), 149 (35), 134 (49)	Feruloyl quinic acid
28	20.89	360	463	301 (72)	Quercetin 3- <i>O</i> -glucoside
29	22.38	356	505	463 (75), 301 (5)	Quercetin- <i>O</i> -acetylhexoside
30	22.8	346	593	285 (6)	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside
31	24.51	344	447	285 (41)	Kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside
32	24.68	354	463	301 (100)	Quercetin- <i>O</i> -hexoside
33	27.15	287, 330sh	491	449*, 287 (59)	Eriodictyol- <i>O</i> -acetylhexoside
34	28.13	342	519	315 (82)	Isorhamnetin- <i>O</i> -acetylhexoside
<i>Anthocyanin</i>					
35	17.77	516	449	287 (100)	Cyanidin 3- <i>O</i> -glucoside
36	20.53	500	433	271 (100)	Pelargonidin 3- <i>O</i> -glucoside
37	21.28	504	519	271 (100)	Pelargonidin 3- <i>O</i> -malonylglucoside
38	31.63	534	–	331 (100)	Malvidin derivative

Note that different chromatographic conditions were used in each case.

maximum at 355 nm, a precursor ion  $[M - H]^-$  at  $m/z$  519, an unique fragment ions at  $m/z$  315 (corresponding to isorhamnetin), due to the loss of –hexosyl + acetyl residues, which allowed its identification as isorhamnetin-*O*-acetylhexoside.

### 3.1.5. Anthocyanins

Several anthocyanins were detected in kidney bean seeds and sprouts. Peaks 35 and 36 were identified as cyanidin-3-*O*-glucoside and pelargonidin-3-*O*-glucoside on the basis of their retention time, mass and UV–vis features by comparison with commercial standards. Peak 37 showed a characteristic UV–vis spectra with maximum at 504 nm of pelargonidin derivative,  $[M + H]^+$  at  $m/z$  519, and fragment at  $m/z$  271 ( $[M - 248]^+$ ), due to the loss of a malonylglucoside moiety. This information allowed its identification as pelargonidin-3-*O*-malonylglucoside. Peak 38 showed  $\lambda_{\max}$  at 534 nm characteristic of malvidin derivative. The presence of malvidin as anthocyanins in this peak was confirmed by its mass spectrum, which showed MS<sup>2</sup> signal at  $m/z$   $[M]^+$  331. This peak was tentatively identified as malvidin derivative.

### 3.2. Effect of germination and elicitation of kidney bean on phenolic profile

Results showed significant differences in the phenolic profile between kidney bean seeds and sprouts (Table 2). Hydroxycinnamic compounds were the most abundant phenolic class detected in kidney

bean seeds and sprouts accounting for approximately 50% of the total phenolic content (Fig. 1). Kidney beans included hydroxycinnamic compounds in free forms (ferulic acid) and those linked to hydroxyacids and sugars, being sinapoyl aldaric acid the main compound of this group in seeds and sprouts. Elicitation treatments decreased the concentration of a large number of these compounds on the sprouts ( $P < 0.05$ ). However, ascorbic acid treatment enhanced by 72% the content of sinapoyl acid derivative compared to control ( $P < 0.05$ ).

The hydroxybenzoic compounds in the form of *p*-hydroxybenzoic acid were found at the same concentration in seeds and sprouts (Table 2). Elicitation caused a significant reduction of the content of this compound, which was not detected in elicited sprouts.

The most outstanding variations found as consequence of germination were those occurred in the flavonoid group. Flavan-3-ols, the main group of flavonoids in kidney bean seeds, decreased significantly in 8-day old sprouts ( $P < 0.05$ ). (+)-Catechin-*O*-acetylhexoside significantly increased in comparison to seeds being the main flavonoid in kidney bean sprouts. (+)-Catechin and catechin glycoside contents decreased significantly in elicited sprouts ( $P < 0.05$ ) with the exception of (+)-catechin-*O*-acetylhexoside in those samples elicited with glutamic acid ( $P > 0.05$ ). Similarly to control, (+)-catechin-*O*-acetylhexoside was the most abundant flavan-3-ol in all elicited sprouts.

Total flavanones and flavonol groups increased considerably in sprouts ( $P < 0.05$ ) (Fig. 1). Control sprouts were richer in hesperetin-*O*-glucuronide hexoside, naringenin derivative, and

Table 2

Individual and total phenolic compounds ( $\mu\text{g/g}$  sprout d.m.) of seeds and sprouts under elicitor treatment.

Compounds	Seeds	Sprouts			
		Control	Ascorbic acid	Folic acid	Glutamic acid
<b>Non-anthocyanins</b>					
<b>Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic compounds</b>					
<i>trans</i> -Feruloyl hexoside acid	4.03 $\pm$ 0.43 <sup>c</sup>	3.32 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.11 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	1.17 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	2.88 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
<i>trans</i> - <i>p</i> -Coumaroyl aldaric acid 1	1.07 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	3.77 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	0.63 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	1.86 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	3.92 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup>
<i>trans</i> -Feruloyl aldaric acid 1	3.72 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	5.56 $\pm$ 0.59 <sup>c</sup>	0.65 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.50 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	1.69 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>
<i>trans</i> - <i>p</i> -Coumaroyl aldaric acid 2	6.43 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup>	6.93 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup>	0.93 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	2.63 $\pm$ 1.49 <sup>a</sup>	6.35 $\pm$ 0.88 <sup>b</sup>
<i>trans</i> -Feruloyl aldaric acid 2	5.20 $\pm$ 1.07 <sup>b</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
<i>trans</i> -Feruloyl aldaric acid 3	12.76 $\pm$ 0.73 <sup>b</sup>	17.03 $\pm$ 0.55 <sup>c</sup>	6.80 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	5.34 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	5.54 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>
<i>trans</i> -Feruloyl aldaric acid 4	15.45 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>	21.76 $\pm$ 0.54 <sup>d</sup>	7.79 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	7.86 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	18.20 $\pm$ 0.72 <sup>c</sup>
Sinapoyl aldaric acid	39.14 $\pm$ 5.54 <sup>c</sup>	8.65 $\pm$ 0.85 <sup>b</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
<i>trans</i> -Feruloyl aldaric acid 5	13.32 $\pm$ 0.97 <sup>c</sup>	10.90 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	6.06 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	6.56 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	10.85 $\pm$ 0.64 <sup>b</sup>
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	10.33 $\pm$ 0.64 <sup>b</sup>	10.00 $\pm$ 0.85 <sup>b</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
<i>trans</i> - <i>p</i> -Coumaroyl derivative acid	0.41 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	1.24 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.33 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.68 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.56 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
<i>trans</i> - <i>p</i> -Coumaroyl acylhexoside acid	2.35 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>	3.60 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>	1.00 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.59 $\pm$ 0.42 <sup>b</sup>	2.11 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
Sinapoyl aldaric acid	12.44 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>	29.36 $\pm$ 1.27 <sup>c</sup>	4.96 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>	3.49 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	3.63 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>
Feruloyl quinic acid	1.39 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	5.32 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup>	3.84 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	3.79 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>	4.23 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>
Sinapoyl derivative acid	13.66 $\pm$ 1.86 <sup>b</sup>	4.29 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>	2.98 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	2.66 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	3.12 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
Sinapoyl derivative acid	11.30 $\pm$ 1.84 <sup>a</sup>	11.23 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	19.27 $\pm$ 1.49 <sup>b</sup>	10.97 $\pm$ 1.25 <sup>a</sup>	10.53 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>
Feruloyl quinic acid	0.83 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	1.60 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>	0.59 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.45 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.51 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>
Ferulic acid	2.71 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	0.66 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.40 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.36 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.45 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
Feruloyl quinic acid	1.21 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.78 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	0.73 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.45 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.94 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>
<b>Flavan-3-ols</b>					
(+)-Catechin O-hexoside	55.11 $\pm$ 5.20 <sup>c</sup>	27.11 $\pm$ 0.80 <sup>b</sup>	4.65 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	8.27 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	3.88 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>
(+)-Catechin O-acetylhexoside	16.51 $\pm$ 0.70 <sup>b</sup>	33.21 $\pm$ 1.43 <sup>d</sup>	12.39 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	25.64 $\pm$ 1.32 <sup>c</sup>	33.26 $\pm$ 1.04 <sup>d</sup>
(+)-Catechin	32.15 $\pm$ 3.94 <sup>b</sup>	3.76 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
<b>Flavanones</b>					
Eriodictyol O-hexoside 1	1.98 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>	1.94 $\pm$ 0.17 <sup>c</sup>	0.37 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.22 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.89 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>
Eriodictyol 7-O-glucoside	0.77 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.31 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.29 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	0.35 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
Hesperitin O-glucuronide-hexoside	6.17 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	16.81 $\pm$ 0.66 <sup>b</sup>	7.10 $\pm$ 1.17 <sup>a</sup>	8.54 $\pm$ 1.23 <sup>a</sup>	9.01 $\pm$ 1.58 <sup>a</sup>
Naringenin derivative	2.57 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	3.89 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup>	1.74 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	2.28 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	2.43 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>
Eriodictyol-O-hexoside 2	nd <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.31 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	0.35 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	0.32 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
Eriodictyol-O-acylhexoside	0.21 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.40 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.39 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.66 $\pm$ 0.03 <sup>cb</sup>	0.85 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>
<b>Flavonols</b>					
Quercetin 3-O-rutinoside	0.54 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	9.83 $\pm$ 0.12 <sup>e</sup>	3.91 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	5.88 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	6.92 $\pm$ 0.16 <sup>d</sup>
Quercetin 3-O-glucuronide	nd <sup>a</sup>	9.21 $\pm$ 0.28 <sup>e</sup>	2.35 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	3.67 $\pm$ 0.80 <sup>c</sup>	5.01 $\pm$ 0.17 <sup>d</sup>
Quercetin 3-O-glucoside	0.79 $\pm$ 0.07 <sup>v</sup>	0.86 $\pm$ 0.02 <sup>v</sup>	0.27 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.61 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	2.03 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>
Quercetin O-acylhexoside	0.96 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	2.60 $\pm$ 0.32 <sup>c</sup>	1.79 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.98 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	2.80 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>
Kaempferol 3-O-rutinoside	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	9.72 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	2.83 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	4.36 $\pm$ 0.29 <sup>c</sup>	5.31 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>
Kaempferol O-glucuronide	nd <sup>a</sup>	6.28 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	1.01 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	1.78 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	2.38 $\pm$ 0.14 <sup>d</sup>
Kaempferol 3-O-glucoside	0.61 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	1.13 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>	0.37 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.51 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.67 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>
Quercetin O-hexoside	0.45 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	0.56 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Kaempferol O-acetylhexoside	nd <sup>a</sup>	0.48 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.54 $\pm$ 0.02 <sup>bc</sup>	0.62 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.96 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>
Isorhamnetin O-acetylhexoside	0.26 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.31 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.33 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.36 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.49 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
<b>Anthocyanins</b>					
Cyanidin 3-O-glucoside	0.31 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.01 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	nd	nd	nd
Pelargonidin 3-O-glucoside	1.90 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.06 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	nd	nd	nd
Pelargonidin 3-O-malonylglucoside	0.02 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.08 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	nd	nd	nd
Malvidin derivative	0.06 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.06 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	nd	nd	nd
Total	279.68 $\pm$ 7.20 <sup>c</sup>	275.71 $\pm$ 9.09 <sup>c</sup>	98.62 $\pm$ 3.69 <sup>a</sup>	117.42 $\pm$ 4.37 <sup>a</sup>	153.06 $\pm$ 3.44 <sup>b</sup>

eriodictyol-O-hexoside 2 as well as in kaempferol and quercetin glycosides than ungerminated seeds (Table 2). Regarding flavanones, hesperitin-O-glucuronide hexoside was the most abundant compound in elicited sprouts, regardless of the elicitor type. Elicitation reduced eriodictyol-O-hexoside 1, hesperitin and naringenin glucosides compared to control ( $P < 0.05$ ). On the contrary, elicited sprouts were higher in eriodictyol-O-hexoside 2 (94%–118% increase) than control ( $P < 0.05$ ). Interestingly, eriodictyol-O-acylhexoside increased by 65% and 112% in sprouts elicited with folic and glutamic acids. Total flavonol content was also reduced by 67%, 51% and 35% in sprouts elicited with ascorbic, folic and glutamic acids, respectively, in comparison to control ( $P < 0.05$ ). Although total flavonol content was lower in elicited sprouts, it must be emphasized that folic and glutamic acids increased several flavonol compounds compared to control (Table 2). After folic acid treatment, kaempferol-O-acetylhexoside was increased by 29.2% in sprouts ( $P < 0.05$ ). Kidney bean sprouts elicited with glutamic acid

improved quercetin 3-O-glucoside, kaempferol-O-acetylhexoside and isorhamnetin-O-acetylhexoside contents that increased by 136%, 100% and 58%, respectively ( $P < 0.05$ ).

Total and individual anthocyanin content was reduced as a result of germination with the exception of pelargonidin-3-O-malonylglucoside that increased in control sprouts ( $P < 0.05$ ; Table 2). Germination in the presence of elicitors brought about a more extensive decrease of total and individual anthocyanin content to levels below the quantification limit.

Considerable variation in the total phenolic content was observed among elicited sprouts (Table 2). Seed treatment with ascorbic, folic and glutamic acids caused a significant decrease (64%, 57% and 44%, respectively) of total phenolic content in sprouts compared to control ( $P < 0.05$ ; Table 2).

Changes in the total and individual phenolic content of sprouts due to germination and elicitation resulted in a considerable variation in the percentage of distribution of phenolic groups. Fig. 1 shows the



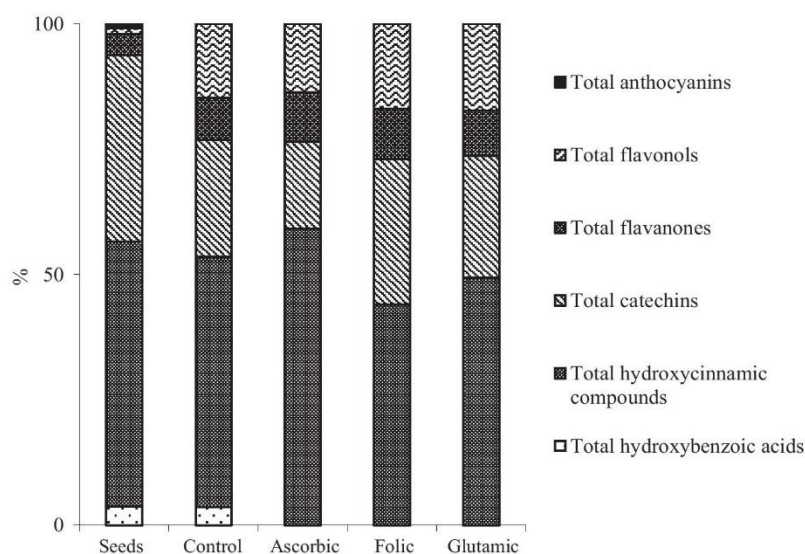


Fig. 1. Percentage of distribution of different phenolic groups to the total phenolic content.

percentage of distribution of different phenolic groups to the total phenolic content. All elicited sprouts showed an absence of hydroxybenzoic acids and anthocyanins. Sprouts treated with ascorbic acid showed a higher percentage of hydroxycinnamic acids (59.1% of the total content) and lower of catechins (17.4% of the total content) than control ( $P < 0.05$ ). Folic acid produced sprouts with lower percentage of hydroxycinnamic acids (44% of the total phenolic content) and higher of flavonoids from catechin, flavanone and flavanol groups (29%, 10% and 16.9% of the total phenolic content) compared to the control. Finally, elicitation with glutamic acid increased the proportion of total flavonols (17.4% of the total phenolic content) compared to control.

### 3.3. Effect of germination and elicitation on antioxidant activity of phenolic extracts from kidney bean sprouts

Antioxidant activity of phenolic extracts obtained from kidney bean seeds and sprouts is presented in Fig. 2. Antioxidant activity of phenolic extracts from control sprouts was significantly similar to seeds ( $P > 0.05$ ). Phenolic extracts from sprouts elicited with ascorbic and

folic acids showed similar ORAC values than control extracts ( $P > 0.05$ ). In contrast, a slight reduction (14%) of the antioxidant activity was observed in phenolic extracts from sprouts treated by glutamic acid ( $P < 0.05$ ).

### 3.4. Effect of germination and elicitation on angiotensin converting enzyme inhibitory activity of phenolic extracts from kidney bean

ACE inhibitory activity of phenolic extracts from seeds, non-elicited (control) and elicited sprouts is shown in Fig. 2. Considerable variation was observed in the ACE inhibition of phenolic extracts among samples. Phenolic extracts from control sprouts showed the lowest ACE inhibition ( $P < 0.05$ ). Lower ACE inhibitory activity of the phenolic extract from control sprouts compared to that from the seeds indicates that germination reduced the ACE inhibitory activity of the phenolic fraction. ACE inhibition values of extracts from elicited sprouts treated with ascorbic acid were higher than control and similar to seeds. Interestingly, phenolic extracts from sprouts treated by folic and glutamic acids were more effective in inhibiting ACE (88% and 62% inhibition, respectively) than extracts from sprouts elicited with ascorbic acid ( $P < 0.05$ ).

### 3.5. Principal Components Analyses (PCA)

PCA was carried out to determine whether there were patterns of bioactivity and total content of phenolic groups which could be associated with an elicitor treatment (Fig. 3A). Seven components were obtained of which the first two ones accounted for 80.3% of the total variance. PC1 primarily separates sprouts treated with elicitors from seeds and control sprouts. Moreover, PC2 separates ascorbic and folic acid treated sprouts from glutamic acid sprouts. The variable projection was useful in determining which phenolic groups or bioactivities are most differentiating. For PC1, ACE inhibitory activity and hydroxycinnamic, hydroxybenzoic, anthocyanin and catechin contents were more dominant in separating all elicited sprouts from control sprouts and seeds. PC2 was positively correlated with flavonols and flavanones. It is worth to emphasize that total content of catechins, hydroxycinnamic and hydroxybenzoic compounds were positively related to ORAC.

A second PCA analysis was performed taking into consideration the percentage of distribution of different phenolic groups and bioactivity of the phenolic fraction normalized to total phenolic content (Fig. 3B).

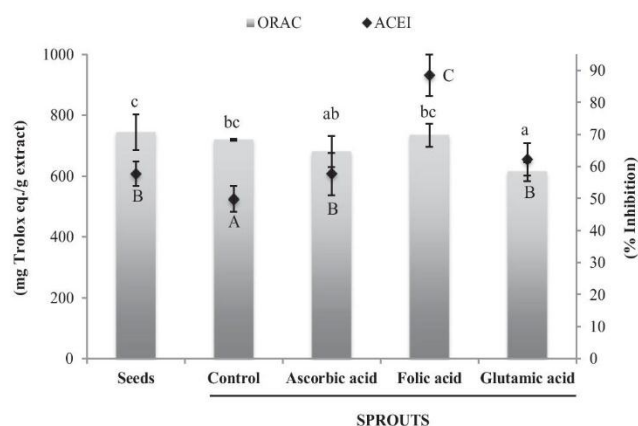
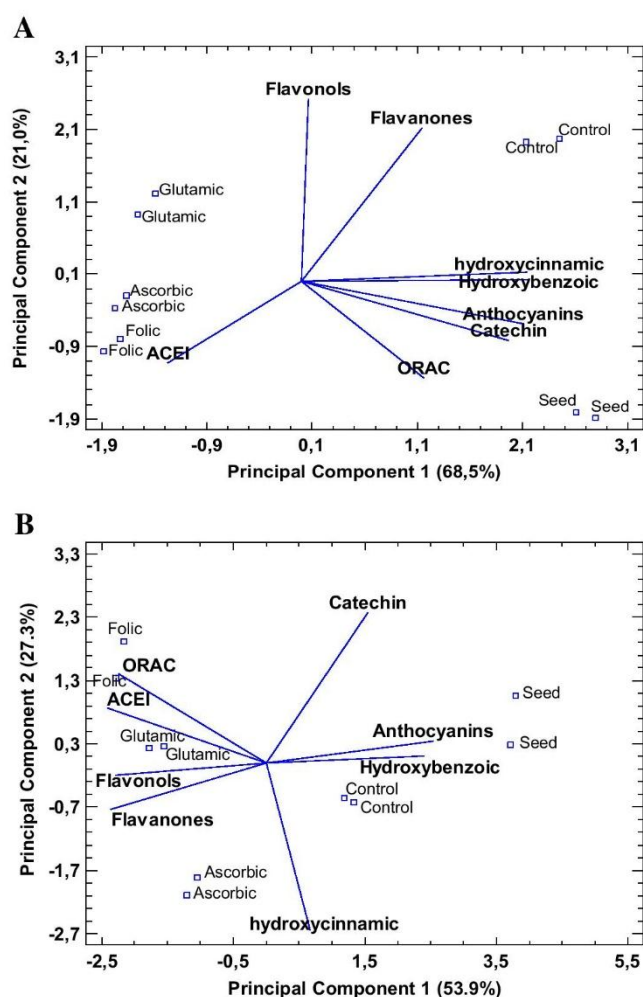


Fig. 2. ORAC (mg Trolox equivalent/g dry extract) and ACEI (% inhibition) activities of phenolic extracts from kidney bean seeds and sprouts. ACEI activity was assayed using an extract concentration of 0.1 mg/mL. Different lowercase and uppercase letters indicate statistical differences for antioxidant and ACEI activity, respectively ( $P < 0.05$ , LSD test). ORAC: antioxidant activity; ACEI: ACE inhibition. Error bars represent the standard deviation of the mean.





**Fig. 3.** Principal Components Analysis (PCA) biplot (score and loading values) for (A) total concentration of phenolic groups and bioactivity (ACEI and ORAC) in seeds, non-elicited (control) and elicited kidney bean sprouts; (B) percentage of distribution of phenolic groups to the total phenolic content and bioactivity (ACEI and ORAC) of phenolic fraction in seeds, non-elicited (control) and elicited kidney bean sprouts. ORAC: antioxidant activity; ACEI: ACE inhibition.

Two principal components (PC1 and PC2) explaining 89.53% of data variations were obtained. As it can be seen in the graph, PC1 was mainly involved in the separation of seeds and germinated samples. Among germinated samples, there was a clear separation between elicited and non-elicited samples. Elicited sprouts showed negative values for PC1 whereas control sprouts and seeds showed positive values for this component. PC1 was positively related to hydroxybenzoic and anthocyanins and negatively related to flavanones, flavonols, ORAC and ACE inhibitory activities. On the contrary, PC2 separated elicited samples as function of elicitor type. Ascorbic acid-elicited sprouts exhibited negative values for this component, whereas folic and glutamic acid-elicited sprouts appeared on the half top of the graph showing positive values for PC2. PC1 was positively related to catechins and negatively to hydroxycinnamic compounds. As seen in the variable projection, percentage of flavanones and flavonols in the phenolic fraction was positively correlated to ORAC and ACE inhibitory activities.

These results emphasized the influence of germination and elicitation on phenolic composition and bioactivity of kidney bean extracts. In addition, the observed effects were dependent on the type of elicitor used.

#### 4. Discussion

Optimizing the phenolic composition of foods has attracted interest as a cost-effective strategy to improve nutrition and disease prevention that would not represent any added costs for the health sector. Specific treatments such as germination alone or in combination with precursor feeding and elicitor application can be used to increase metabolite production in the sprouts and enhance its nutritional value (Poulev et al., 2003; Smetanska, 2008).

Beans are good sources of phenolic compounds (Hayat, Ahmad, Masud, Ahmed, & Bashir, 2014). The present study showed that total phenolic content of kidney bean var. Pinto was in the range of that reported for other bean varieties (19.1–48.3 mg/100 g) (Lin, Harnly, Pastor-Corrales, & Luthria, 2008; López-Amorós et al., 2006; Luthria & Pastor Corrales, 2006). Phenolic fraction was composed mostly of sinapoyl acid derivatives (hydroxycinnamic acids) unlike other bean varieties in which ferulic aldaric acid derivatives are the most abundant phenolic compounds (Lin et al., 2008; López et al., 2013). Flavonoids were also detected mainly as catechin aglycone and O-glycoside. Flavanones (eriodictyol, hesperitin and naringenin glycosides), flavonols (kaempferol and quercetin glycosides) and anthocyanins (pelargonidin, cyanidin and malvidin glycosides) were also present as minor compounds. All these flavonoids were previously reported in different bean varieties (Lin et al., 2008; López et al., 2013; Macz-Pop, Rivas-Gonzalo, Perez-Alonso, & González-Paramás, 2006). Proanthocyanidins were not detected in kidney bean var. Pinto although they were described in other bean varieties (Aguilera, Estrella, Benítez, Esteban, & Martín-Cabrejas, 2011; López et al., 2013). Our results indicated that total phenolic content of kidney bean remained stable after 8 days of germination, contrary to earlier studies showing an increase in the total phenolic content of legumes after germination (Dueñas, Hernández, Estrella, & Fernández, 2009; Shohag, Wei, & Yang, 2012; Tajoddin, Manohar, & Lalitha, 2014).

Regarding flavonoid groups, germination brought about a general decrease in flavan-3-ols and anthocyanins that was compensated with a higher content of flavanones and flavonols. These changes in the phenolic composition could be explained by the activation of phenolic metabolism (Khandelwal, Upidi, & Ghugre, 2010) being dependent on legume type and germination conditions (López-Amorós et al., 2006; Świeca et al., 2012). New phenolic compounds (eriodictyol-O-hexoside 2, quercetin glucuronide, kaempferol glucuronide and acylhexoside) were identified in kidney bean sprouts indicating their de novo synthesis, which indicates the activation of the phenylpropanoid pathway. Biosynthesis of phenolic compounds can be drastically induced by elicitation in plant derived-foods. Our study showed that elicitor treatments during 8 days of germination promote the synthesis and accumulation of different flavonoid compounds (flavanones and flavanol O-glycosides), depending on the elicitor type. However, most of phenolic compounds decreased in kidney bean sprouts as consequence of elicitation. This effect could be attributed to the activation of hydroxylases and polyphenoloxylases (Świeca et al., 2012). Randhir and Shetty (2007) reported that ascorbic acid treatment enhances in a time-dependent manner guaiacol peroxidase activity in fava bean sprouts. This enzyme is involved in cell wall modifications (lignification and suberization). This finding suggests that longer times of germination in the presence of elicitors could result in an increased partition of soluble phenolics to lignification lowering the total content of free phenolic compounds. In contrast with our results, other studies have reported that abiotic elicitation increased total free phenolic content of legume sprouts (Shetty, Atallah, & Shetty, 2003; Randhir, Lin, & Shetty, 2004; Burguires et al., 2007; Limón et al., 2014; Świeca, Seczyk, & Gawlik-Dziki, 2014). These differences could be attributed to elicitor nature, doses and time of treatment (Baenas et al., 2014) being these effects more dependent on plant genetics than on the elicitor nature. For instance, ascorbic acid (500  $\mu$ M), folic acid (50  $\mu$ M) or proline are able to increase the total phenolic content



in pea (Burguières et al., 2007) and fava bean (Randhir & Shetty, 2007) sprouts due to the up-regulation of the pentose phosphate pathway. Lentil supplementation with 0.1 mM phenylalanine or tyrosine increased slightly the total phenolic and flavonoid content of 4-day old sprouts (Świeca, Baraniak, & Gawlik-Dziki, 2014). Differences observed between our study and previous literature data could be also attributed to the methodology used to determine total phenolic content. Earlier studies have used the colorimetric Folin–Ciocalteu method to quantify total phenolic content in seeds and elicited legume sprouts. This method is less reliable for total phenolic quantification as it interferes with nitric compounds and reducing sugars and does not correlate well with the sum of individual phenolic compounds evaluated chromatographically (Siger et al., 2012).

Kidney bean germination and elicitation did not affect radical scavenging activity of kidney bean sprouts with the exception of glutamic acid treatment, which induced a significant decrease of ORAC values. Previous literature data showed controversial results on the effect of germination on the antioxidant activity of sprouts (Aguilera et al., 2015; Guajardo-Flores, Serna-Saldívar, & Gutiérrez-Urbe, 2013) probably due to plant genetics and germination conditions. Previous research showed that elicitors increase total phenolic content and, consequently, antioxidant activity of sprouts (Świeca, Seczyk, & Gawlik-Dziki, 2014). In the present study no correlation was found between total phenolic content and antioxidant activity which could be due to differences in phenolic compositional and structural complexity of extracts from seeds and sprouts. Different studies have revealed the important role that phenolic structure plays in its radical scavenging activity; the position and number of hydroxyl groups in the basic structure significantly affect antioxidant activity of such molecules (Jing et al., 2012). Structure–activity analysis showed that *p*-coumaric acid exhibits the largest oxygen radical absorbance capacity, followed by ferulic acid, and hydroxybenzoic acids (Koroleva et al., 2014), which are mostly present in seeds and sprouts. Furthermore, esters of *p*-coumaric and ferulic acids are good inhibitors of oxidative stress in biochemical and cell culture models (Kanski, Aksenova, Stoyanova, & Butterfield, 2002; Meyer, Donovan, Pearson, Waterhouse, & Frankel, 1998). Besides phenolic compounds, other additional antioxidants such as melatonin and vitamins could be contributing to overall radical scavenging activity of legume sprouts (Aguilera et al., 2015; Fernández-Orozco et al., 2008).

Sprouts exhibited a lower ACE inhibition activity than kidney bean seeds. By contrast, elicitor treatment produced an increase in ACE inhibitory activity of sprouts compared to control germination, being this effect outstanding in elicited sprouts with folic acid. No reports have been found about the effect of germination and elicitation on the antihypertensive potential of sprouts. Previous in vitro and in vivo studies have demonstrated that certain flavonoids (anthocyanins, flavones, flavanones, flavanols and flavones) have an inhibitory effect on ACE activity, which plays a key role in the regulation of arterial blood pressure (Aviram & Dornfeld, 2001; Guerrero et al., 2012). Quercetin and kaempferol are among the most potent ACE inhibitors out of 39 phenolic compounds belonging to different structural subtypes (Al Shukor et al., 2013; Guerrero et al., 2012). Higher ACE inhibition activity of flavonols has been reported to be due to the combination of the following elements in the flavonoid structure: the catechol group in the B-ring, the double bond between C2 and C3 at the C-ring, and the cetone group in C4 at the C-ring (Guerrero et al., 2012). A significant linear correlation between ACE inhibitory activity and eriodictyol-*O*-acetylhexoside ( $r = 0.789$ ,  $p = 0.02$ ) was found that could explain the highest ACE inhibition observed in elicited sprouts with folic acid.

## 5. Conclusions

Germination in the presence of elicitors gave rise to important changes in the phenolic profile and bioactivity of sprouts. A general

decrease in the concentration of total and individual phenolic compounds was observed in elicited sprouts, although an enhancement in the content of specific flavanones (eriodictyol derivatives) and flavonols (quercetin and kaempferol derivatives) was found. Elicitor treatment positively affected the ACE inhibitory activity of sprouts while no improvements were found for antioxidant activity. Folic acid was the most suitable elicitor to improve phytochemical quality and maximize the health-promoting properties of kidney bean sprouts.

## Acknowledgments

This work was cofunded by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad through the project number AGL2010-16310 and the European Union through FEDER programme. R.I.L. thanks CSIC and European Societal Funds for providing a PhD fellowship. M.D. and E.P. thanks the Spanish “Ramón y Cajal” Program for financial support.

## References

- Aguilera, Y., Estrella, I., Benítez, V., Esteban, R.M., & Martín-Cabrejas, M.A. (2011). Bioactive phenolic compounds and functional properties of dehydrated bean flours. *Food Research International*, 44(3), 774–780.
- Aguilera, Y., Herrera, T., Benítez, V., Arribas, S.M., López De Pablo, A.L., Esteban, R.M., et al. (2015). Estimation of scavenging capacity of melatonin and other antioxidants: Contribution and evaluation in germinated seeds. *Food Chemistry*, 170(1), 203–211.
- Al Shukor, N., Van Camp, J., Gonzales, G.B., Staljanovski, D., Struijs, K., Zotti, M.J., et al. (2013). Angiotensin-converting enzyme inhibitory effects by plant phenolic compounds: A study of structure activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(48), 11832–11839.
- Alonso, R., Aguirre, A., & Marzo, F. (2000). Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chemistry*, 68(2), 159–165.
- Aviram, M., & Dornfeld, L. (2001). Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*, 158(1), 195–198.
- Baenas, N., García-Viguera, C., & Moreno, D.A. (2014). Elicitation: A tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules*, 19(9), 13541–13563.
- Bouchenak, M., & Lamri-Senhadj, M. (2013). Nutritional quality of legumes, and their role in cardiometabolic risk prevention: A review. *Journal of Medicinal Food*, 16(3), 185–198.
- Burguières, E., McCue, P., Kwon, Y.I., & Shetty, K. (2007). Effect of vitamin C and folic acid on seed vigour response and phenolic-linked antioxidant activity. *Bioresource Technology*, 98(7), 1393–1404.
- Burguières, E., McCue, P., Kwon, Y.I., & Shetty, K. (2008). Health-related functionality of phenolic-enriched pea sprouts in relation to diabetes and hypertension management. *Journal of Food Biochemistry*, 32(1), 3–14.
- Del Rio, D., Rodríguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818–1892.
- Donkor, O.N., Stojanovska, L., Ginn, P., Ashton, J., & Vasiljevic, T. (2012). Germinated grains—Sources of bioactive compounds. *Food Chemistry*, 135(3), 950–959.
- Dueñas, M., Hernández, T., Estrella, I., & Fernández, D. (2009). Germination as a process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of lupin seeds (*Lupinus angustifolius* L.). *Food Chemistry*, 117(4), 599–607.
- Duranti, M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77(2), 67–82.
- Fernández-Orozco, R., Frias, J., Zielinski, H., Piskula, M.K., Kozłowska, H., & Vidal-Valverde, C. (2008). Kinetic study of the antioxidant compounds and antioxidant capacity during germination of *Vigna radiata* cv emerald, *Glycine max* cv jutro and *Glycine max* cv merit. *Food Chemistry*, 111(3), 622–630.
- Fernández-Orozco, R., Piskula, M.K., Zielinski, H., Kozłowska, H., Frias, J., & Vidal-Valverde, C. (2006). Germination as a process to improve the antioxidant capacity of *Lupinus angustifolius* L. var. Zapaton. *European Food Research and Technology*, 223(4), 495–502.
- García-Marino, M., Hernández-Hierro, J.M., Rivas-Gonzalo, J.C., & Escribano-Bailón, M.T. (2010). Colour and pigment composition of red wines obtained from maceration of Tempranillo and Graciano varieties. *Analytica Chimica Acta*, 660(1–2), 134–142.
- Gravidel, R.A., & Prakash, J. (2007). The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, in vitro iron and calcium bioavailability and in vitro starch and protein digestibility of some legume seeds. *LWT—Food Science and Technology*, 40(7), 1292–1299.
- Guajardo-Flores, D., Serna-Saldívar, S.O., & Gutiérrez-Urbe, J.A. (2013). Evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities of extracted saponins and flavonols from germinated black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 141(2), 1497–1503.
- Guerrero, L., Castillo, J., Quiñones, M., García-Vallvé, S., Arola, L., Pujadas, G., et al. (2012). Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: Structure–activity relationship studies. *PLoS ONE*, 7(11), e49493.



- Hayat, I., Ahmad, A., Masud, T., Ahmed, A., & Bashir, S. (2014). Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): An overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(5), 580–592.
- Jing, P., Zhao, S.J., Jian, W.J., Qian, B.J., Dong, Y., & Pang, J. (2012). Quantitative studies on Structure–DPPH · scavenging activity relationships of food phenolic acids. *Molecules*, 17(11), 12910–12924.
- Kanski, J., Aksenova, M., Stoyanova, A., & Butterfield, D.A. (2002). Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxyl radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: Structure–activity studies. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(5), 273–281.
- Khandelwal, S., Upidi, S.A., & Ghuge, P. (2010). Polyphenols and tannins in Indian pulses: Effect of soaking, germination and pressure cooking. *Food Research International*, 43(2), 526–530.
- Koroleva, O., Torkova, A., Nikolaev, I., Khrameeva, E., Fedorova, T., Tsentlovich, M., et al. (2014). Evaluation of the antiradical properties of phenolic acids. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), 16351–16380.
- Limón, R.I., Peñas, E., Martínez-Villaluenga, C., & Frias, J. (2014). Role of elicitation on the health-promoting properties of kidney bean sprouts. *LWT—Food Science and Technology*, 56(2), 328–334.
- Lin, L., Harnly, J.M., Pastor-Corrales, M.S., & Luthria, D.L. (2008). The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 107(1), 399–410.
- Liu, H.K., Cao, Y., Huang, W.N., Guo, Y.D., & Kang, Y.F. (2013). Effect of ethylene on total phenolics, antioxidant activity, and the activity of metabolic enzymes in mung bean sprouts. *European Food Research and Technology*, 237(5), 755–764.
- López, A., El-Naggar, T., Dueñas, M., Ortega, T., Estrella, E., Hernández, T., et al. (2013). Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 138(1), 547–555.
- López-Amorós, M.L., Hernández, T., & Estrella, I. (2006). Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. *Journal Food Composition and Analysis*, 19(4), 277–283.
- Luthria, D.L., & Pastor Corrales, M.A. (2006). Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2–3), 205–211.
- Macz-Pop, G.A., Rivas-Gonzalo, J.C., Perez-Alonso, J.J., & González-Paramás, A.M. (2006). Natural occurrence of free anthocyanin glycosides in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 94(3), 448–456.
- Martínez-Villaluenga, C., Torino, M.I., Martín, V., Arroyo, R., García-Mora, P., Estrella, I., et al. (2012). Multifunctional properties of soy milk fermented by *Enterococcus faecium* strains isolated from raw soy milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(41), 10235–10244.
- Meyer, A.S., Donovan, J.L., Pearson, D.A., Waterhouse, A.L., & Frankel, E.N. (1998). Fruit Hydroxycinnamic acids inhibit human low-density lipoprotein oxidation in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1783–1787.
- Poulev, A., O'Neal, J.M., Logendra, S., Pouleva, R.B., Timeva, V., Garvey, A.S., et al. (2003). Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(12), 2542–2547.
- Randhir, R., Lin, Y.T., & Shetty, K. (2004). Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry*, 39(5), 637–646.
- Randhir, R., & Shetty, K. (2007). Elicitation of the proline-linked pentose phosphate pathway metabolites and antioxidant enzyme response by ascorbic acid in dark germinated fava bean sprouts. *Journal of Food Biochemistry*, 31(4), 485–508.
- Rebello, C.J., Greenway, F.L., & Finley, J.W. (2014). A review of the nutritional value of legumes and their effects on obesity and its related co-morbidities. *Obesity Review*, 15(5), 392–407.
- Rondini, E.A., Barrett, K.G., & Bennink, M.R. (2013). Nutrition and human health benefits of dry beans and pulses. In M. Siddiq & M.A. Uebersax (Eds.), Hoboken NJ, USA: Wiley-Blackwell.
- Shetty, P., Atallah, M.T., & Shetty, K. (2003). Stimulation of total phenolics, L-DOPA and antioxidant activity through proline-linked pentose phosphate pathway in response to proline and its analogue in germinating fava beans (*Vicia faba*). *Process Biochemistry*, 38(12), 1707–1717.
- Shohag, M.J.I., Wei, Y., & Yang, X. (2012). Changes of folate and other potential health-promoting phytochemicals in legume seeds as affected by germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 9137–9143.
- Siger, A., Czubiński, J., Kachlicki, P., Dwiecki, K., Lampart-Szczapa, E., & Nogala-Kalucka, M. (2012). Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(2), 190–197.
- Smetanska, I. (2008). Production of secondary metabolites using plant cell cultures food biotechnology. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 111, 187–228.
- Świeca, M., & Baraniak, B. (2014). Influence of elicitation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on phenolics content, antioxidant potential and nutritional quality of *Lens culinaris* sprouts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(3), 489–496.
- Świeca, M., Baraniak, B., & Gawlik-Dziki, U. (2014). Effect of selected divalent cations on protein mobilization in lentil (*Lens culinaris*) sprouts. *Journal of Elementology*, 19(2), 577–585.
- Świeca, M., Gawlik-Dziki, U., Kowalczyk, D., & Złotek, U. (2012). Impact of germination time and type of illumination on the antioxidant compounds and antioxidant capacity of *Lens culinaris* sprouts. *Scientia Horticulturae*, 140(1), 87–95.
- Świeca, M., Seczyk, L., & Gawlik-Dziki, U. (2014). Elicitation and precursor feeding as tools for the improvement of the phenolic content and antioxidant activity of lentil sprouts. *Food Chemistry*, 161(15), 288–295.
- Tajoddin, M., Manohar, S., & Lalitha, J. (2014). Effect of soaking and germination on polyphenol content and polyphenol oxidase activity of mung bean (*Phaseolus aureus* L.) cultivars differing in seed color. *International Journal of Food Properties*, 17(4), 782–790.
- Thériault, M., Caillet, S., Kermasha, S., & Lacroix, M. (2006). Antioxidant, antiradical and antimutagenic activities of phenolic compounds present in maple products. *Food Chemistry*, 98(3), 490–501.
- Torino, M.I., Limón, R.I., Martínez-Villaluenga, C., Mäkinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde, C., et al. (2013). Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chemistry*, 136(2), 1030–1037.



## **4.2 Mejora del contenido de compuestos bioactivos y de las propiedades biológicas de leguminosas (*L. culinaris* var. castellana y *P. vulgaris* var. pinto) mediante fermentación. Obtención de ingredientes funcionales dirigidos a la prevención de la hipertensión.**

La fermentación de leguminosas es un proceso prometedor en la elaboración de ingredientes y alimentos funcionales que aprovecha el metabolismo de los microorganismos involucrados para modificar la composición y el contenido de sus constituyentes, de manera que se potencien las propiedades saludables de estos alimentos. Algunos estudios indican que la fermentación incrementa el contenido de compuestos involucrados en el control de la presión arterial, como compuestos fenólicos, péptidos bioactivos y GABA. En este sentido, diversos autores han puesto de manifiesto que durante la fermentación de soja y judía tiene lugar un aumento del contenido de polifenoles totales (Oboh y col., 2009; Starzynska-Janiszewska y col., 2014), un incremento en el contenido de ácidos fenólicos (Dueñas y col., 2012) y una biotransformación de formas conjugadas de las isoflavonas a agliconas biológicamente más activas (Dueñas y col., 2012; Lee y col., 2013). Así mismo, se ha descrito la liberación de péptidos antioxidantes, inhibidores de la ECA y antiinflamatorios (Rho y col., 2009; Martínez-Villaluenga y col., 2012; Wang y col., 2013) y la formación de GABA (Liao y col., 2013) por acción de diferentes microorganismos fermentativos, durante la fermentación de judías adzuki y soja. Estos estudios sugieren que la fermentación es una herramienta biotecnológica valiosa para fomentar la acumulación de compuestos bioactivos y favorecer las propiedades beneficiosas de las leguminosas. Sin embargo, estos estudios han sido realizados en condiciones de fermentación determinadas y se centran en incrementar el contenido de un único compuesto bioactivo, o de una familia de compuestos bioactivos. No obstante, hasta la fecha de realización de este estudio, no teníamos constancia de ningún trabajo sistemático dirigido a estudiar la viabilidad de diferentes procesos de fermentación para maximizar el contenido de fitoquímicos en las leguminosas y obtener así ingredientes multifuncionales. En consecuencia nos planteamos potenciar la acumulación de compuestos fenólicos totales, GABA y las actividades antioxidante e inhibidora de la ECA en lentejas castellanas (*L. culinaris* L. var.

castellana) (Publicación III) y judías pintas (*P. vulgaris* var. pinto) (Publicación IV) mediante diversas condiciones de fermentación. En judías pintas, además, se investigó el efecto del proceso de fermentación en la composición pormenorizada de los compuestos fenólicos (Publicación IV). En estos estudios hemos considerado interesante emplear como cultivos iniciadores *B. subtilis*, bacteria descrita en la bibliografía como altamente proteolítica, y *L. plantarum* CECT 748, que ha demostrado tener un sistema enzimático muy complejo capaz de hidrolizar las globulinas de la leguminosas (Kiers y col., 2000; Frias y col., 2008; Martínez-Villaluenga y col., 2012), de catalizar la bioconversión de compuestos fenólicos complejos a otros con mayor actividad antioxidante (Dueñas y col., 2012) y de sintetizar GABA (Di Cagno y col., 2010). La elección de estos microorganismos supone, por tanto, un sólido punto de partida para la obtención de ingredientes multifuncionales derivados de judías y lentejas.

A continuación se presentan los resultados de este estudio en forma de dos publicaciones:

**Publicación III.** Propiedades antioxidantes y antihipertensivas de lentejas fermentadas en estados líquido y sólido.

**Publicación IV.** La fermentación mejora el contenido de compuestos bioactivos en extractos de judía.

### **Publicación III. Propiedades antioxidantes y antihipertensivas de lentejas fermentadas en estados líquido y sólido.**

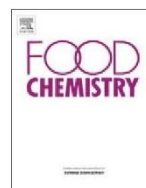
Maria Inés Torino, Rocío I. Limón, Cristina Martínez-Villaluenga, Sari Mäkinen, Anne Pihlanto, Concepción Vidal-Valverde, Juana Frias. Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chemistry*, **2013**,136:1030-1037.

#### **RESUMEN**

El propósito de este estudio fue evaluar el efecto de la fermentación de lenteja en estados líquido (LSF) y sólido (SSF) para la producción de extractos hidrosolubles con propiedades antioxidantes y antihipertensivas. La LSF se realizó de manera natural o mediante la adición de *L. plantarum*, mientras que la SSF se realizó empleando *B. subtilis* como cultivo iniciador. El crecimiento de BAL en la fermentación natural fue más rápido que en la fermentación inducida con *L. plantarum*, observándose un incremento de hasta 7,4 y 1,2 log UFC/mL, respectivamente, a las 48 h de fermentación. En cambio, en la SSF los recuentos de *B. subtilis* aumentaron 4,0 log UFC/g a ese mismo tiempo. Las fracciones hidrosolubles obtenidas por LSF mostraron un mayor grado de hidrólisis y mayor contenido de GABA, así como de las actividades antioxidante e inhibidora de la ECA que las obtenidas mediante SSF. Los ingredientes obtenidos por NF a las 96 h presentaron el mayor potencial antihipertensivo, ya que mostraron el mayor contenido de GABA (10,42 mg/g de extracto), y altas actividades de inhibición de la ECA ( $IC_{50} = 0,18$  mg proteína/mL) y antioxidante (0,26 mmol trolox equivalentes/g de extracto). En conclusión, la LSF demostró ser el proceso más eficaz para obtener ingredientes funcionales dirigidos a la prevención de la hipertensión.







## Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils

Maria Inés Torino<sup>a</sup>, Rocío I. Limón<sup>b</sup>, Cristina Martínez-Villaluenga<sup>b</sup>, Sari Mäkinen<sup>c</sup>, Anne Pihlanto<sup>c</sup>, Concepción Vidal-Valverde<sup>b</sup>, Juana Frias<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> CCT CERELA-CONICET, Chacabuco 145, 4000 SM Tucumán, Argentina

<sup>b</sup> Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

<sup>c</sup> MTT Biotechnology and Food Research, FIN-31600 Joikionen, Finland

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 June 2012

Received in revised form 30 July 2012

Accepted 5 September 2012

Available online 17 September 2012

#### Keywords:

Lentils

Fermentation

Functional ingredients

Antioxidant capacity

Antihypertensive compounds

### ABSTRACT

The effect of liquid (LSF) and solid state fermentation (SSF) of lentils for production of water-soluble fractions with antioxidant and antihypertensive properties was studied. LSF was performed either spontaneously (NF) or by *Lactobacillus plantarum* (LP) while SSF was performed by *Bacillus subtilis* (BS). Native lactic flora in NF adapted better than *L. plantarum* to fermentative broth and BS counts increased 4.0 log CFU/g up to 48 h of SSF. LSF water-soluble fractions had higher ( $P \leq 0.05$ ) free amino groups, GABA content, antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory (ACEI) activities than SSF. In addition, GABA and ACEI activity of LSF increased in a time-dependent manner. Proteolysis by BS was limited, with slight changes in free amino groups, while GABA, total phenolic compounds and antioxidant capacity increased throughout fermentation. Higher antihypertensive potential was observed in NF (96 h) characterised by the highest GABA content (10.42 mg/g extract), ACE-inhibitory potency (expressed as  $IC_{50}$ ) of 0.18 mg protein/ml and antioxidant capacity of 0.26 mmol Trolox equivalents/g extract. Therefore, water-soluble fermented lentil extracts obtained by LSF are particularly promising as functional ingredients in preventing hypertension.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) remain the biggest cause of deaths worldwide. More than 17 million people died from CVDs in 2008 (WHO, 2011). In terms of attributable deaths, the leading cardiovascular risk factor globally is raised blood pressure (to which 13% of global deaths are attributed) (WHO, 2009). Implementing population-wide interventions such as promoting physical activity with a healthy diet has been estimated to be a low-cost and highly feasible option to prevent and control CVD. Frequent consumption of legumes, as part of a healthy diet, has been inversely associated with CVD (Bazzano et al., 2001; Flight & Clifton, 2006). Human studies have shown that legume consumption attenuate oxidative stress, improves serum antioxidant capacity and reduces serum concentration of total and low-density lipoprotein-cholesterol, triglycerides, adhesion molecules and inflammatory biomarkers, all of which are risk factors for the development of CVD (Azadbakht et al., 2007; Crujeiras, Parra, Abete, & Martínez, 2007; Esmailzadeh & Azadbakht, 2012; Taku et al., 2007). These protective effects of legumes against CVD have been related to their nutritional composition (Campos-Vega,

Loarca-Piña, & Oomah, 2010). Legumes, besides its high protein, dietary fibre and slow-digesting carbohydrates content are good sources of phenolic compounds such as flavonoids, isoflavones and phenolic acids. Several studies demonstrated that legume proteins and fibre have lipid-lowering effects (Sirtori et al., 2012). Additionally, legume proteins are sources of hypotensive peptides with angiotensin converting-enzyme (ACE) inhibitory activity (Boye & Maltais, 2011). Flavonoids have been reported as dietary modulators of cardiovascular function by regulation of blood pressure (Galleano, Pechanova, & Fraga, 2010), oxidative stress (Cordova, Sumpio, & Sumpio, 2012; Siow & Mann, 2010) and inflammation (Pan, Lai, Dushenkov, & Ho, 2009) in the cardiovascular system.

Lentil (*Lens culinaris*, L.) is among the oldest commodities cultivated by humans with a global consumption steadily increasing. The annual production has increased from 4 million tons (MT) in 2009 to more than 5 MT in 2010 (FAO, 2012). Unlike other legumes, lentil contains higher amounts of total phenolic compounds, saponins and condensed tannins (Campos-Vega, Loarca-Piña, & Oomah, 2010). Moreover, recent studies have shown the potential application of lentil protein hydrolysates as hypotensive ingredients containing angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides (Barbana & Boye, 2011; Boye, Roufik, Pesta, & Barbana, 2010). Therefore, lentils could be considered as a valuable source of cardioprotective compounds.

\* Corresponding author. Tel.: +34 912587510; fax: +34 915644853.

E-mail address: [frias@ictan.csic.es](mailto:frias@ictan.csic.es) (J. Frias).



Fermentation is an ancient technology for enhancing the shelf-life, nutritional and organoleptic quality of food (Doblado, Frias, Muñoz, & Vidal-Valverde, 2003). Recently, this bioprocess has been applied for the production and extraction of bioactive compounds in the food, chemical and pharmaceutical industries (Martins et al., 2011). In the last years, fermentation has been performed to increase the content of bioactive phenolic compounds in legumes, thus enhancing their antioxidant activity (Fernandez-Orozco et al., 2007; Lee, Hung, & Chou, 2008). Additionally, bioconversion of conjugate forms of phenolic compounds to their free forms during fermentation improves their health-link functionality. For instance, microbial biotransformation of isoflavones to aglycones and equol improved the antiosteoporotic and anti-inflammatory effect of fermented soymilk (Chiang & Pan, 2011; Di Cagno et al., 2010). Moreover, lactic acid bacteria have been employed to produce ACE-inhibitory peptides and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in foods, both useful in the prevention and treatment of hypertension (Kono & Himeno, 2000; Matheson, Freed, & Tunnicliff, 1986; Ricci, Artacho, & Olalla, 2010). In contrast, fermentation has not been extensively applied for production of antihypertensive compounds in legumes, with the exception of soybean (Juan & Chou, 2010).

The objective of the present work was to study the efficiency of liquid (LSF) and solid state fermentation (SSF) of lentil for production of water-soluble fractions with antioxidant and antihypertensive properties. This study has addressed the use of the liquid-fraction that results from LSF, which is generally a by-product in the food industry. This fraction can be collected and concentrated as a source of soluble-containing bioactive products overcoming, at the same time, the environmental problems connected with the dumping. In addition, SSF is an economically favourable fermentation system due to its lower impact on the environment, smaller fermenter-size and, reduced downstream processing and stirring as well as lower sterilisation costs (Hölker & Lenz, 2005; Raghavarao, Ranganathan, & Karanth, 2003).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Seeds

Lentil seeds (*Lens culinaris* var. *castellana*) were provided by Legumbres Iglesias (Salamanca, Spain). Seeds were cleaned and stored in darkness in polyethylene containers at 4–8 °C.

### 2.2. Selection criteria and preparation of cultures

*Bacillus subtilis* CECT 39<sup>T</sup> (ATCC 6051) and *Lactobacillus plantarum* CECT 748<sup>T</sup> (ATCC 14917) from the Spanish Type Culture Collection (CECT) were selected for SSF and LSF, respectively, based on their GRAS (Generally Recognized As Safe) status and different physiology. *L. plantarum* grows well in the conditions established in LSF (microaerophilic atmosphere, diluted medium) while *B. subtilis* performs well in the conditions established in SSF (aerobic atmosphere, concentrated medium, low water activity). Cultures were stored at –20 °C in 10% (w/v) sterile reconstituted skimmed milk containing 0.5% (w/v) yeast extract (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain), 1.0% (w/v) glucose (Sigma, St. Louis, MO) and 10% (v/v) glycerol (Sigma). *B. subtilis* was grown in Brain Heart Infusion (BHI) broth (Conda S.A. Laboratories, Torrejón de Ardoz, Madrid, Spain) for 16 h at 30 °C. *L. plantarum* was grown in De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Conda S.A. Laboratories) for 16 h at 37 °C.

Bacterial cells were propagated twice (2%, v/v) prior experimental use, recovered by centrifugation (8000 rpm for 5 min at 6 °C) and washed twice in sterile saline solution (0.90% NaCl, w/v). Ob-

tained suspensions were used as inocula for solid or liquid fermentations.

### 2.3. Lentil fermentation

#### 2.3.1. Liquid state fermentation (LSF)

LSFs were carried out in a New Brunswick 3 L BioFlo/Celligen 115 Fermentor (Eppendorf Iberica, Madrid, Spain) using lentil flour (sieved at 0.5 mm) suspended in sterile distilled water in a proportion of 200 g/L. Fermentations were carried out either spontaneously with the only microorganisms present on the seeds (natural fermentation, NF) or by inoculation of *L. plantarum* suspension ( $10^8$  CFU/ml) at 1–2% (v/v) (LP). LSF were run for 96 h at 37 °C and 350 rpm. Samples were aseptically collected at 0, 48 and 96 h to determine changes in bacterial populations and pH. Afterwards, samples were centrifuged (10,000 rpm for 15 min at 6 °C) and supernatants were freeze-dried for further analysis. LSF was performed in triplicate. Non-fermented samples collected at 0 h were used as negative control.

#### 2.3.2. Solid state fermentation (SSF)

SSF was carried out using cracked lentils (100 g) suspended in sterile distilled water (1:2 w/v) for 16 h at 6 °C, and subsequently autoclaved at 121 °C for 15 min. Sterile cracked seeds were homogeneously inoculated with 5% (v/w) of *B. subtilis* ( $10^5$  CFU/g) saline suspension, vigorously mixed and aseptically distributed over Petri dishes at a ratio of 30 g, as in Fernandez-Orozco et al. (2007). A climatic chamber (Snijders-Scientific, Tiburg, Netherlands) was used to incubate the dishes for 96 h at 30 °C and 90% humidity. SSF was monitored by withdrawing samples at 0, 48 and 96 h to determine changes in bacterial populations and pH. Afterwards, the samples were autoclaved at 121 °C for 15 min and freeze-dried for further analysis. SSF was performed in triplicate. Non-fermented samples collected at 0 h were used as negative control.

### 2.4. Microbiological analysis

Plate counts method in appropriate agarised media was used to determine viable cells of the following microorganisms: Lactic acid bacteria (LAB) were counted in MRS agar plates after incubation in an 5% CO<sub>2</sub> atmosphere during 72 h; aerobic mesophilic bacteria were grown in Plate-Count Agar containing (w/v) 0.5% tryptone (Conda S.A. Laboratories), 0.25% yeast extract (Scharlau Chemie S.A.), 0.1% glucose (Sigma) and 1.5% agar (Conda S.A. Laboratories), after incubation at 30 °C during 72 h; yeasts and moulds were enumerated on sabouraud chloramphenicol agar (Scharlau Chemie S.A.) after incubation at 25 °C for 5 days; *Enterobacteriaceae* were counted in violet red bile glucose agar (VRBG, Conda S.A. Laboratories) plates incubated at 30 °C for 24 h. Coliforms were determined in violet red bile lactose agar (VRBA, Scharlau Chemie S.A.) plates incubated at 37 °C for 24 h. *B. subtilis* was enumerated in BHI broth supplemented with 1.5% (w/v) agar, plates incubated at 30 °C for 48 h. Cell counts were expressed as log<sub>10</sub> CFU/ml.

### 2.5. Extracts preparation

LSF extracts corresponded to the recovered freeze-dried supernatants after fermentation of lentil flour. The yield after freeze-drying was ~3.5 g extract per 100 ml of supernatant. For LSF extracts, 20 mg were dissolved in 1 ml of distilled water just before analysis. For SSF, 500 mg of freeze-dried SSF-lentils were suspended in 10 ml of cold distilled water and kept overnight in continuous agitation at 4 °C. Afterwards, samples were centrifuged at 15,000 rpm for 20 min at 4 °C and supernatant was collected. The residue was then suspended in 2 ml of cold distilled water, vortexed and centrifuged in the same conditions. The supernatants were collected, fil-



tered through Whatman n° 1 paper and freeze-dried. Five mg of freeze-dried sample were dissolved in 1 ml of distilled water just before analysis.

## 2.6. Chemical analysis

### 2.6.1. GABA content

The quantification of GABA in fermented lentil extracts was conducted by high-performance liquid chromatography as described in Rozan, Kuo, and Lambein (2000), with some modifications. Briefly, 50 µl of fermented lentil extracts were derivatised with phenylisothiocyanate (PITC 99%, Sigma–Aldrich). Allyl-L-glycine (Sigma–Aldrich) was used as internal standard. The chromatographic system consisted of an Alliance Separation Module 2695 (Waters, Milford, USA), a Photodiode Array detector 2996 set at 242 nm (Waters) and a personal computer running the Empower 2 for Microsoft Windows chromatographic software (Waters). Sample (20 µl) was injected onto a C18 reversed phase Alltima 250 × 4.6 mm i.d., 5 µm size column (Alltech) equipped with a guard column (Alltech) at a constant temperature of 43 °C. The chromatogram was developed at a flow rate of 1.0 ml/min by eluting in a linear gradient mobile phase A (0.1 M ammonium acetate pH 6.5) and mobile phase B (0.1 M ammonium acetate, acetonitrile, methanol, 44/46/10, v/v/v, pH 6.5) as follows: 100% A for 15 min, 100% B for 25 min, 100% B for 7 min and finally, column was equilibrated with 100% A for 5 min. The content of GABA in the extracts was quantified from a calibration curve built with standard GABA (Sigma–Aldrich) and with the response factor relative to the internal standard. Regression coefficients were always >0.99. Results were expressed in mg/g of extract.

### 2.6.2. Total phenolic content (TPC)

TPC was determined in fermented lentil extracts using the Folin–Ciocalteu reagent as described by Singleton, Orthofer, & Lamuella-Raventos (1999). Briefly, 100 µl of diluted extract was mixed with 625 µl of distilled water, 250 µl 7.5% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 25 µl of 2 N Folin–Ciocalteu reagent (Sigma–Aldrich). Samples were vortexed and incubated for 2 h at room temperature in darkness. The absorbance was measured at 739 nm using a microplate reader (Synergy HT microplate reader, BioTek Instruments). Total phenolics were quantified by external calibration using gallic acid (Sigma–Aldrich) as standard. Samples were independently analysed in triplicate and results were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per g of extract (mg GAE/g).

### 2.6.3. Antioxidant capacity

Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) was determined in fermented lentil water-soluble fractions by fluorescence (ORAC-FL) as described by Dávalos, Gómez-Cordovés, and Bartolomé (2004). The reaction was carried out at 37 °C in 75 mM phosphate buffer at pH 7.4, and the final assay mixture (200 µl) contained 70 nM fluorescein (Sigma–Aldrich), 12 mM 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (Sigma–Aldrich), and Trolox (Sigma–Aldrich) [concentration range 1–8 µM] or different dilutions of sample. 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride and Trolox solutions were prepared daily, and fluorescein was diluted from a stock solution (1.17 mM) in 75 mM phosphate buffer at pH 7.4. Fluorescence measurements were carried out on a Synergy HT microplate reader (BioTek Instruments) equipped with a fluorescent filter ( $\lambda_{\text{excitation}}$  485 nm and  $\lambda_{\text{emission}}$  520 nm) using a black 96 well plate (Fisher Scientific, Spain). The plate was automatically shaken before the first reading, and the fluorescence was recorded every minute for 150 min. The equipment was controlled by Gene5™ software (version 1.1.). All reaction mixtures were prepared in triplicate, and at least two independent analyses were performed for each sample. The areas under the fluorescence

decay curve (AUC), based on relative fluorescence values to the initial reading were recorded and the AUC of blanks subtracted. Results were expressed as mmol of Trolox equivalents (TE)/g of extract.

### 2.6.4. Free amino groups content

The free amino groups content was measured with 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) using the method described by Adler-Nissen (1979) adapted to a microplate reader. Twenty-five microlitres of sample extracts were added to 200 µl 0.2125 M phosphate buffer at pH 8.2. Then, 200 µl of 0.01% TNBS (Sigma–Aldrich) were added. Microtubes were shaken and placed in a water bath at 50 °C in darkness for 60 min. Reaction was stopped by adding 400 µl 0.1 N HCl, and microtubes were allowed to stand at room temperature for 30 min. After that period, absorbance was read at 340 nm in a Synergy HT multimode microplate reader (BioTek Instruments, IncVermont, USA). The blank was carried out by replacing the sample with water. Calibration curve was plotted using L-Leucine as standard (Sigma–Aldrich) dissolved in 1% sodium-dodecyl sulphate (Sigma–Aldrich) at a concentration range from 0 to 1.5 mM. Results were expressed as mmol Leu/g of extract.

### 2.6.5. Soluble protein content

Protein concentration of water-soluble fractions was determined using the DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) following the manufacturer's instructions and bovine serum albumin (Sigma–Aldrich) was used as the standard at a concentration range from 0 to 1 mg/ml. Results were expressed in mg protein/g of extract.

### 2.6.6. ACE inhibitory activity

ACE-inhibitory activity was determined following the method described by Hyun and Shin (2000). In the assay, 90 µl of hippuryl-L-histidyl-L-leucine solution (5 mM in 0.1 M borate buffer pH 8.3, containing 0.4 M NaCl) were incubated with 10 µl of sample (1 mg protein/ml) at 37 °C for 5 min at 250 rpm, after which 30 µl of ACE solution (60 mU/ml) were added and incubated for 1 h with the above condition. The hippuric acid (HA) liberated by ACE was measured by RP-HPLC on a Novapak C8 (3.9 × 150 mm, 4 µm, Waters, Milford, USA) column. The injection volume was 10 µl, the flow rate was 1 ml/min with a linear gradient (0–88% in 29 min) of acetonitrile in 0.1% TFA, and the effluent was monitored at 228 nm. All determinations were carried out in duplicate. ACE-inhibitory activity was calculated according to the following equation: Inhibitory activity (%) = [(HA<sub>control</sub> × HA<sub>sample</sub>)/HA<sub>control</sub>] × 100. The IC<sub>50</sub> value was defined as the concentration of extract (in mg protein/ml) required to reduce 50% the height of the HA peak (50% ACE inhibition). IC<sub>50</sub> values were determined by the non-linear regression sigmoidal dose–response curves in which the range of protein concentrations was transformed to logarithmic scale using the curve fit function in GraphPad Prism 4.00 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## 2.7. Statistical analysis

Each fermentation experiment was carried out in triplicate and water-soluble lentil fractions were analysed in duplicate. Data were expressed as means of the three independent replicates. One-way analysis of variance (ANOVA) using the least significant difference test was conducted to determine differences among samples at the same fermentation time and among time within the same fermentation type with the Statgraphic 4.0 software (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA).



### 3. Results and discussion

#### 3.1. Growth and acidification activity of microbial populations during lentil fermentation

Table 1 shows pH values and major microbial populations during LSF of lentils by indigenous LAB (NF) and *L. plantarum* (LP). The pH fell from 6.63 to 3.72 and 3.53 up to 48 h for NF and LP, respectively, and no further changes were observed thereafter. Regarding microbial population, enterobacteria was the predominant group of total mesophiles (56.6% in average) followed by LAB (Table 1) at the beginning of NF. Native LAB was the predominant bacterial group at 48 h showing higher growth ( $\Delta\log 8.9$ ) in NF than *L. plantarum* ( $\Delta\log 2.0$ ) in LP at the same fermentation time. LAB viability was maintained for 96 h in NF while *L. plantarum* viability fell 3.0 log units in LP (Table 1). The sanitary quality of lentil flour was improved by *L. plantarum* inoculation. Indeed, enterobacteria, coliforms, yeasts and moulds were not detected in LP after 48 h. On the contrary, yeasts and moulds reached 51 CFU/ml in NF after 48 h. pH gradually decreased as lentil fermentation progressed, and the presence of LAB was expected to be responsible for it, as shown in other legumes (Fernandez-Orozco et al., 2007, 2008). This decline in pH during fermentation is known to act as a preservative factor against bacteria associated with spoilage and against non-desirable and pathogenic microorganisms which are not able to

proliferate under these conditions (Nout, Rombouts, & Havelaar, 1989; Wang & Hesselte, 1981).

The pH values and microbial population during SSF of lentils with *B. subtilis* (BS) are shown in Table 1. An increase of 0.63 pH units was observed after 96 h of fermentation which suggests limited release of ammonia. *B. subtilis* is able to grow over a wide pH range producing proteases responsible of raising the pH up to 8.5 by the release of peptides and, in last instance, ammonium (Sarkar & Tamang, 1995). The pH reached during BS seems to be dependent on temperature as it has been shown in *natto*-like products obtained by cultivation of 38 *B. subtilis* strains (Chantawannakul, Oncharoen, Klanbut, Chukeatirote, & Lumyong, 2002). High temperatures (45 °C) resulted in higher activity of *B. subtilis* proteases which has been associated with higher ammonia concentration. Lentil fermentation with *B. subtilis* at 37 °C resulted in lower pH values (6.9), possibly associated to lower protease activity.

Total mesophile counts were similar to *B. subtilis* counts after 48 and 96 h of fermentation. This indicates that only *B. subtilis* grew throughout SSF of lentil. *B. subtilis* counts increased about 4.0 log units from the beginning of incubation to 48 h, and no further changes were observed thereafter. Enterobacteria, yeasts and moulds were not detected throughout BS. In steamed black soybean, Wu and Chou (2009) found that *B. subtilis* BCRC 14715 grew rapidly at 30–50 °C reaching 9.5 logs CFU/ml after 18 h, regardless the cultivation temperature.

**Table 1**

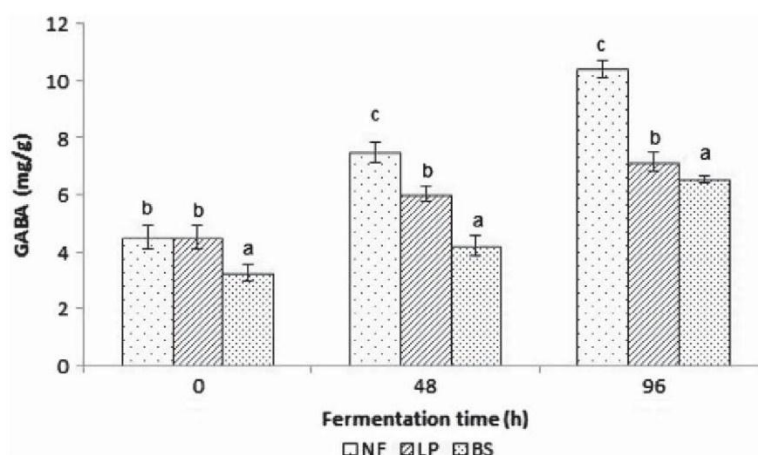
Cell counts and acidification of microbial populations during fermentation of lentil (*Lens culinaris* var. *castellana*).

Fermentation	Time (h)	pH	Microbial Population (log CFU/mL or log CFU/g)				
			Aerobic mesophilic bacteria	Lactic acid bacteria	<i>B. subtilis</i>	Enterobacteria <sup>a</sup>	Yeast and moulds <sup>a</sup>
NF	0	6.63	3.34 ± 0.15	1.45 ± 0.12	<1	2.58 ± 0.10	<1
	48	3.72	8.85 ± 0.10	8.85 ± 0.23	<1	<1	<1
	96	3.67	8.23 ± 0.19	8.82 ± 0.26	<1	<1	<1
LP	0	6.63	7.45 ± 0.09	7.48 ± 0.04	<1	2.56 ± 0.08	<1
	48	3.53	8.82 ± 0.04	8.65 ± 0.19	<1	<1	<1
	96	3.46	5.74 ± 0.12	5.62 ± 0.21	<1	<1	<1
BS	0	6.27	5.42 ± 0.17	ND	5.53 ± 0.05	<1	<1
	48	6.36	9.05 ± 0.45	ND	9.14 ± 0.25	<1	<1
	96	6.90	9.06 ± 0.17	ND	8.82 ± 0.28	<1	<1

Values are means of three independent fermentations ± standard deviation.

NF, natural fermentation; LP, *L. plantarum*; BS, *B. subtilis*.

<sup>a</sup> The lowest dilution tested was 1 CFU/mL.



**Fig. 1.** GABA content in fermented lentil water-soluble extracts obtained from liquid and solid state fermentation. Each bar corresponds to the mean of three independent replicates with error bars indicating the standard deviations. Different letters indicate significant differences among samples at the same fermentation time ( $P \leq 0.05$  in one way ANOVA analysis). NF, natural fermentation; LP, *L. plantarum*; BS, *B. subtilis*.



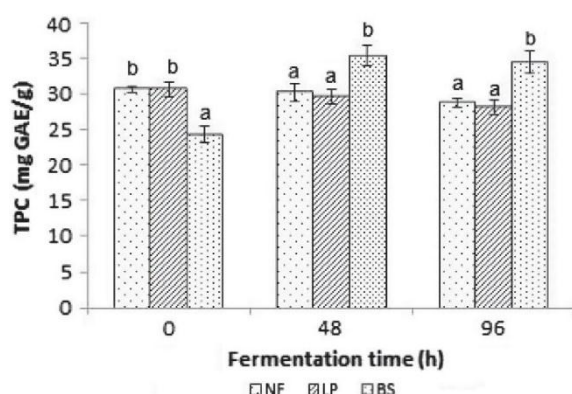
### 3.2. GABA production during lentil fermentation

GABA content of lentil increased significantly ( $P \leq 0.05$ ) in a time-dependent manner, regardless the fermentation system employed (Fig. 1). The highest GABA content was observed in lentil extracts obtained by NF (10.42 mg/g extract) followed by LP (7.16 mg/g extract) and BS (6.54 mg/g extract) after 96 h. The development of GABA-enriched foods is of special interest in the treatment of hypertension. This study shows for first time GABA production in lentil by two different fermentation systems: liquid and solid-state fermentation. Soybean has been the only legume seed used as raw material for the development of GABA-enriched products so far. Aoki et al. (2003) developed a fermentation process for the preparation of GABA-enriched tempeh-like product that exhibited hypotensive effect on spontaneously hypertensive rats (Aoki, Furuya, Endo, & Fujimoto, 2003). Those GABA-tempeh products contained 1 g of GABA per 100 g of product, a concentration quite similar to that observed in water-soluble extracts from naturally fermented (NF) lentil.

### 3.3. Total phenolic content during lentil fermentation

Lentil seeds are an interesting source of polyphenols which are in part responsible for their antioxidant activity (Dueñas, Hernández, & Estrella, 2009; Velioglu, Mazza, Gao, & Oomah, 1998). Non-fermented water-soluble extracts showed 30 mg GAE/g extract, indicating that water is an efficient solvent for extracting phenolic compounds (Sulaiman, Sajak, & Ooi, 2011). No significant differences ( $P \geq 0.05$ ) in TPC were found between NF and LP, and a slight down tendency was observed after 96 h (28 mg GAE/g extract for both fermentations) (Fig. 2). Fernandez-Orozco et al. (2007) observed an increase in TPC after 48 h of natural and induced fermentation by *L. plantarum* of soybean flours. These results are in agreement with those reported by Tabera, Frías, Estrella, Villa, and Vidal-Valverde (1995) and Bartolomé, Hernández, and Estrella (1997) in different fermented lentil varieties. Dueñas, Fernández, Hernández, Estrella, and Muñoz (2005) suggested that natural and induced fermentation by *L. plantarum* is an adequate process for improving the concentration of phenolic compounds in fermented cowpea (*Vigna sinensis*) flour. In addition, they reported that complex polyphenols are hydrolysed to other simpler and biologically more active compounds during fermentation.

SSF of lentils performed with *B. subtilis* led to a significant ( $P \leq 0.05$ ) rise in TPC, from 24 mg GAE/g to 34–35 mg GAE/g after



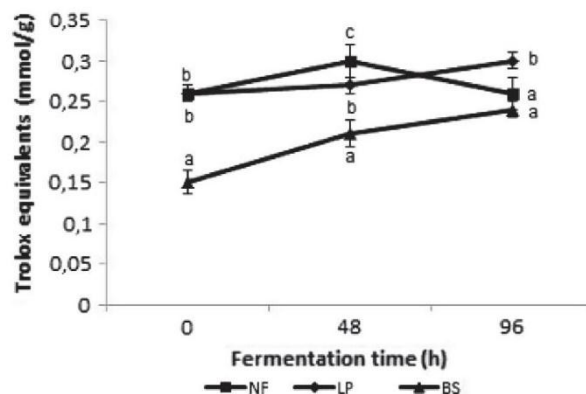
**Fig. 2.** Total phenolic content in fermented lentil water-soluble extracts obtained from liquid and solid-state fermentation. Each bar corresponds to the mean of three independent replicates with error bars indicating the standard deviations. Different letters indicate significant differences among samples at the same fermentation time ( $P \leq 0.05$  in one way ANOVA analysis). NF, natural fermentation; LP, *L. plantarum*; BS, *B. subtilis*.

48 and 96 h of fermentation (Fig. 2). These results are in agreement with those reported in soybean fermented by *Bacillus* strains (Fernandez-Orozco et al., 2007; Juan & Chou, 2010).

### 3.4. Antioxidant activity of fermented lentil extracts

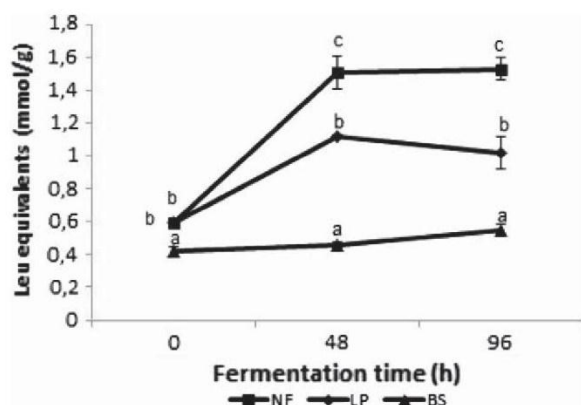
Oxidative stress has been assigned as a causing factor of hypertension by decreasing nitric oxide availability for smooth muscle relaxation (Berry, Brosnan, Fennell, Hamilton, & Dominiczak, 2001). Therefore, production of foods providing antioxidant capacity is of special interest in the field of functional food research. In this context, antioxidant capacity of fermented lentil extracts was measured using ORAC-FL assay, one of the most used methods for antioxidant capacity determination. NF and LP fermentations for 48 h increased significantly ( $P \leq 0.05$ ) the antioxidant capacity of water-soluble extracts. Longer fermentation time up to 96 h led to either non-significant changes ( $P \geq 0.05$ ) or slight ( $P \leq 0.05$ ) rises in NF and LP extracts, respectively (Fig. 3). These results are in accordance with those reported by Fernandez-Orozco et al. (2007) who found that soybean fermentation by *L. plantarum* provided higher antioxidant capacity than natural fermentation.

On the other hand, SSF showed lower antioxidant activity than LSF (Fig. 3). Lentil fermentation by *B. subtilis* raised ORAC levels from 0.17 to 0.22 and 0.24 mmol TE/g up to 48 and 96 h, respectively. These values were lower ( $P \leq 0.05$ ) than those found in LSF lentil extracts. These results differ substantially from those found in *B. subtilis* fermented soybean flours that presented higher antioxidant capacity than liquid-state fermented flours (Fernandez-Orozco et al., 2007). These results indicate that during legume fermentation different changes take place in antioxidant components that depend on the type of legume, the fermentation process, the microorganism involved and the extract preparation. In addition, no correlation was found between TPC and ORAC values. Although it has been suggested that the phenolic content of plant materials is usually correlated with their antioxidant capacity (Velioglu, Mazza, Gao, & Oomah, 1998), the results found in fermented water-soluble lentil extracts show that TPC and the extent of antioxidant capacity are not necessarily correlated, possibly due to antioxidant compounds do not usually act alone. Niki and Noguchi (2000) postulated that the interaction among antioxidants can affect total antioxidant capacity, producing synergistic or antagonistic effects. Results obtained from lentil flour (Dueñas et al., 2005) and black soybeans (Kim, Son, & Oh, 2009) fermentations support this statement.



**Fig. 3.** Antioxidant capacity in fermented lentil water-soluble extracts obtained from liquid and solid-state fermentation. Each value corresponds to the mean of three independent replicates with error bars indicating the standard deviations. Different letters indicate significant differences among samples at the same fermentation time ( $P \leq 0.05$  in one way ANOVA analysis). NF, natural fermentation; LP, *L. plantarum*; BS, *B. subtilis*.





**Fig. 4.** Free amino groups content in fermented lentil water-soluble extracts obtained from liquid and solid-state fermentation. Each value corresponds to the mean of three independent replicates with error bars indicating the standard deviations. Different letters indicate significant differences among samples at the same fermentation time ( $P \leq 0.05$  in one way ANOVA analysis). NF, natural fermentation; LP, *L. plantarum*; BS, *B. subtilis*.

### 3.5. Proteolytic activity of microbial populations during lentil fermentation

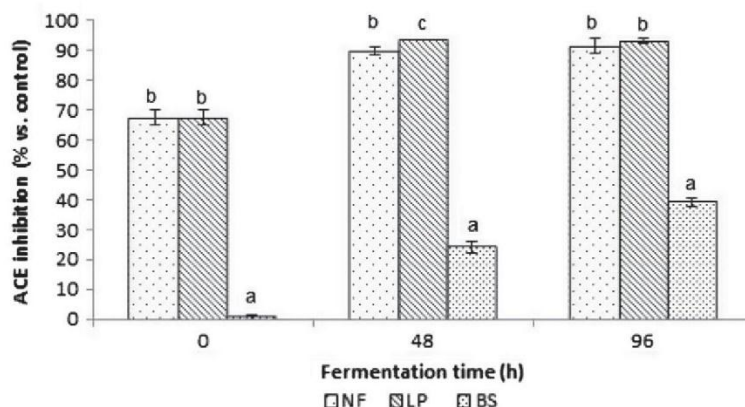
Bioactive peptides can be produced during fermentation by microbial proteases (Ricci, Artacho, & Olalla, 2010), therefore, proteolytic activity expressed as free amino-groups released during fermentation was measured. Free amino groups released during LSF of lentil were measured on water-soluble extracts as mmol Leu equivalents/g of dry extract (Fig. 4). Free amino groups increased ( $P \leq 0.05$ ) from 0.6 mmol Leu/g to 1.5 mmol Leu/g in NF after 48 h and no larger changes were observed thereafter. LP released lower free amino groups than NF which reached 1.1 and 1.0 mmol Leu/g after 48 h and 96 h, respectively (Fig. 4). Our results indicate that natural microbial population exhibited higher proteolytic activity than *L. plantarum*. In the case of fermentation with *B. subtilis*, free amino groups slightly increased ( $P \leq 0.05$ ) from 0.42 mmol Leu/g extract to 0.46 mmol Leu/g after 48 h and 0.55 mmol Leu/g after 96 h of fermentation (Fig. 4). These results suggest that SSF of lentil released lower free amino groups than LSF, despite the high proteolytic activity associated to *B. subtilis* (Chantawannakul et al., 2002; Sarkar, Cook, & Owens, 1993). These results might be linked to the initial steaming process carried out with the cracked seeds before SSF (Section 2.3.1.). This thermal

treatment could cause protein denaturalisation and further insolubilisation, as it has been previously found in faba bean, lentil and chickpea over a pH range from 2.0 to 10.0 (Carbonaro, Cappelloni, Nicoli, Lucarini, & Carnovale, 1997). In fact, albumins are more susceptible to heat than other protein fractions, as it has been observed in cooked karkade seeds and lentils (Suliman et al., 2008; Yagoub, Mohamed, Ahmed, & El Tinay, 2004).

### 3.6. ACE inhibitory activity of fermented lentil extracts

ACE modulates arterial blood pressure converting angiotensin I, an inactive decapeptide, into angiotensin II, and octapeptide with potent vasoconstrictor action (Skeggs et al., 1957). Moreover, ACE degrades bradykinin which exerts an important vasodilation activity. Inhibition of ACE by natural or synthetic inhibitors has been shown to reduce blood pressure in experimental animals and humans (Hong et al., 2008). Several research studies have shown that protein hydrolysates from lentils contain ACE-inhibitory peptides (Bamdad, Dokhani, Keramat, & Zareie, 2009; Barbana & Boye, 2011; Boye, Roufik, Pesta, & Barbana, 2010). Hydrolysis of proteins occur throughout fermentation and bioactive peptides with ACE inhibitory activity may be released by the action of microbial proteases or proteases from specialised protein bodies found in the organelles of seeds (Müntz, Belozersky, & Dunaevsky, 2001). The ACE inhibitory activity of fermented lentil extracts is shown in Fig. 5. NF improved ACE inhibitory activity of lentil extracts from 67.5% to 90% and 92% inhibition after 48 and 96 h, respectively. Similarly, LP led to even higher ACE inhibition values (93% regardless fermentation time). Contrary to LSF, extracts from lentils fermented by *B. subtilis* showed lower ( $P \leq 0.05$ ) ACE inhibitory activity (24% and 39% after 48 and 96 h, respectively). The lower ACE inhibitory activity observed in SSF may be attributed to variations in the type of ACE-inhibitory peptides released which will depend on enzyme specificity and the specific structure of the parent proteins. Additionally, processing conditions can also greatly influence the release of ACE-inhibitory peptides (Gómez-Ruiz, Ramos, & Recio, 2004). In this way, proteases from native LAB, *L. plantarum* and *B. subtilis* might differ in their activity and/or specificity. In addition, steaming of cracked seeds before SSF may cause protein denaturation and aggregation which can make difficult the access of the enzyme to the substrate and, hence, the low ACE inhibitory activity observed in SSF at 0 h.

$IC_{50}$  values were calculated only in those LSF extracts with higher ACE inhibition, obtained after 96 h fermentation. NF and LP water soluble extracts exhibited similar  $IC_{50}$  values (0.18 and



**Fig. 5.** ACE inhibitory activity (%) of fermented lentil water-soluble extracts obtained by liquid and solid-state fermentations. Each bar corresponds to the mean of three independent replicates with error bars indicating the standard deviations. Different letters indicate significant differences among samples at the same fermentation time ( $P \leq 0.05$  in one way ANOVA analysis). NF, natural fermentation; LP, *L. plantarum*; BS, *B. subtilis*.



0.20 mg protein/ml, respectively). To our knowledge, this is the first time that ACE inhibitory activity is reported in liquid-state fermented lentil extracts. LSF lentil extracts obtained in the present study exhibited a more potent ACE-inhibitory activity compared to lentil protein hydrolysates ( $IC_{50} = 0.44$  mg protein/ml) (Boye et al., 2010) which indicate LSF lentil extracts as a particularly promising potential to be used as functional ingredients.

#### 4. Conclusions

Our results reveal that fermentation of lentils is an eligible process to obtain water soluble extracts with potential antihypertensive compounds (GABA and ACE inhibitors) as well as antioxidant properties. Although LSF and SSF fermentations of lentils provided functional water soluble extracts, those obtained by LSF have higher health-promoting potential against hypertension and could extend the possibilities for value-added applications of fermented lentils. Furthermore, with the growing consumer interest for functional foods, identification of avenues for the use of lentil purified extracts aimed at preventing hypertension could be promising. Thus, our group is currently performing further studies to identify the compounds responsible for ACE inhibitory activity in fermented lentil extracts and to evaluate the bioefficacy of those ingredients in animal models.

#### Acknowledgements

This work was supported by AGL2010-16310 projects from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain). M.I.T. is indebted to CONICET (Argentina) for the Foreign Postdoctoral Fellowship under the Scholarship Program for Young Researchers 2010 and R.I.L. to a JAE-pre grant funded by CSIC and FSE-EU.

#### References

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 1256–1262.
- Aoki, H., Furuya, Y., Endo, Y., & Fujimoto, K. (2003). Effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid-enriched tempeh-like fermented soybean (GABA-tempeh) on the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67, 1806–1808.
- Aoki, H., Uda, I., Tagami, K., Furuya, Y., Endo, Y., & Fujimoto, K. (2003b). The production of a new tempeh-like fermented soybean containing a high level of  $\gamma$ -aminobutyric acid by anaerobic incubation with *Rhizopus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67, 1018–1023.
- Azadbakht, L., Kimiagar, M., Mehrabi, Y., Esmailzadeh, A., Hu, F. B., & Willett, W. C. (2007). Dietary soya intake alters plasma antioxidant status and lipid peroxidation in postmenopausal women with the metabolic syndrome. *British Journal of Nutrition*, 98, 807–813.
- Bamdad, F., Dokhani, S., Keramat, J., & Zareie, R. (2009). The impact of germination and *in vitro* digestion on the formation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from lentil proteins compared to whey proteins. *Engineering and Technology*, 49, 36–46.
- Barbana, C., & Boye, J. I. (2011). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. *Food Chemistry*, 127, 94–101.
- Bartolomé, B., Hernández, M. T., & Estrella, I. (1997). Changes in the phenolic composition of lentils (*Lens culinaris*) during germination and fermentation. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 205, 290–294.
- Bazzano, L. A., He, J., Ogden, L. G., Loria, C., Vupputuri, S., Myers, L., et al. (2001). Legume consumption and risk of coronary heart disease in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. *Archives of Internal Medicine*, 161, 2573–2578.
- Berry, C., Brosnan, M. J., Fennell, J., Hamilton, C. A., & Dominiczak, A. F. (2001). Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 10, 247–255.
- Boye, J. I., & Maltais, A. (2011). Pulses: A novel protein source. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 22, 24–26.
- Boye, J. I., Roufik, S., Pesta, N., & Barbana, C. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties and SDS-PAGE of red lentil protein hydrolysates. *LWT – Food Science and Technology*, 43, 987–991.
- Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G., & Oomah, B. D. (2010). Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Research International*, 43, 461–482.
- Carbonaro, M., Cappelloni, M., Nicoli, S., Lucarini, M., & Carnovale, E. (1997). Solubility–digestibility relationship of legume proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3387–3394.
- Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chuksatirote, E., & Lumyong, S. (2002). Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *ScienceAsia*, 28, 241–245.
- Chiang, S.-S., & Pan, T.-M. (2011). Antiosteoporotic effects of *Lactobacillus*-fermented soy skim milk on bone mineral density and the microstructure of femoral bone in ovariectomized mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7734–7742.
- Cordova, A. C., Sumpio, B. J., & Sumpio, B. E. (2012). Perfecting the plate: Adding cardioprotective compounds to the diet. *American College of Surgeons*, 214, 97–114.
- Crujeiras, A. B., Parra, D., Abete, I., & Martinez, J. A. (2007). A hypocaloric diet enriched in legumes specifically mitigates lipid peroxidation in obese subjects. *Free Radical Research*, 41, 498–506.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC–fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 48–54.
- Di Cagno, R., Mazzacane, F., Rizzello, C. G., Vincentini, O., Silano, M., Giuliani, G., et al. (2010). Synthesis of isoflavone aglycones and equol in soy milks fermented by food-related lactic acid bacteria and their effect on human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10338–10346.
- Doblado, R., Frias, J., Muñoz, R., & Vidal-Valverde, C. (2003). Fermentation of *Vigna sinensis* var. carilla flours by natural microflora and *Lactobacillus*. *Journal of Food Protection*, 65, 2313–2320.
- Dueñas, M., Fernández, D., Hernández, T., Estrella, I., & Muñoz, R. (2005). Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L.). Modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *Journal of Science and Food Agriculture*, 85, 297–304.
- Dueñas, M., Hernández, T., & Estrella, I. (2009). Comparative study of the phenolic composition in lentils processed with and without addition of commercial tannase. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33, 695–713.
- Esmailzadeh, A., & Azadbakht, L. (2012). Legume consumption is inversely associated with serum concentrations of adhesion molecules and inflammatory biomarkers among Iranian women. *The Journal of Nutrition*, 142, 334–339.
- Fernandez-Orozco, R., Frias, J., Muñoz, R., Zielinski, H., Piskula, M. K., Kozłowska, H., et al. (2007). Fermentation as a bio-process to obtain functional soybean flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8972–8979.
- Fernandez-Orozco, R., Frias, J., Muñoz, R., Zielinski, H., Piskula, M. K., Kozłowska, H., et al. (2008). Effect of fermentation conditions on the antioxidant capacity of *Lupinus angustifolius* cv. zapaton. *European Food Research and Technology*, 227, 979–988.
- Flight, I., & Clifton, P. (2006). Cereal grains and legume in the prevention of coronary heart disease and stroke: A review of the literature. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60, 1145–1159.
- Food and Drug Administration. (2012). <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> Accessed 17.05.2012.
- Galleano, M., Pechanova, O., & Fraga, C. G. (2010). Hypertension, nitric oxide, oxidants, and dietary polyphenols. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11, 837–848.
- Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M., & Recio, I. (2004). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal*, 14, 1075–1080.
- Hyun, C. K., & Shin, H. K. (2000). Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochemistry*, 36, 65–71.
- Hölker, U., & Lenz, J. (2005). Solid-state fermentation: Are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*, 8, 301–306.
- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W., & Chi, L. (2008). The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs? *Peptides*, 29, 1062–1071.
- Juan, M. Y., & Chou, C. C. (2010). Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715. *Food Microbiology*, 27, 586–591.
- Kim, S. Y., Son, H. S., & Oh, S. H. (2009). Characteristics of Korean soybean paste (*Doenjang*) prepared by the fermentation of black soybeans. *Journal of Food Science and Nutrition*, 14, 134–141.
- Kono, I., & Himeno, K. (2000). Change in gamma-aminobutyric acid content during beni-koji making. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 64, 617–619.
- Lee, I. H., Hung, Y. H., & Chou, C. C. (2008). Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 150–156.
- Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, 29, 365–373.
- Matheson, G. K., Freed, E., & Tunnicliff, G. (1986). Central receptor binding and cardiovascular effects of GABA analogues in the cat. *General Pharmacology: The Vascular System*, 18, 269–273.
- Müntz, K., Belozersky, M. A., & Dunayevsky, Y. E. (2001). Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1741–1752.
- Niki, E., & Noguchi, N. (2000). Evaluation of antioxidant capacity. What capacity is being measured by which method? *Life*, 50, 323–329.

- Nout, M. J. R., Rombouts, F. M., & Havelaar, A. (1989). Effect of accelerated natural lactic fermentation of infant food ingredients on some pathogenic microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 8, 351–361.
- Pan, M.-H., Lai, C.-S., Dushenkov, S., & Ho, C.-T. (2009). Modulation of inflammatory genes by natural dietary bioactive compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4467–4477.
- Raghavarao, K. S. M. S., Ranganathan, T. V., & Karanth, N. G. (2003). Some engineering aspects of solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 127–135.
- Ricci, I., Artacho, R., & Olalla, M. (2010). Milk protein peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory (ACEI) activity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 390–402.
- Rozan, P., Kuo, Y. H., & Lambein, F. (2000). Free amino acids present in commercially available seedlings sold for human consumption. A potential hazard for consumers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 716–723.
- Sarkar, P. K., Cook, P. E., & Owens, J. D. (1993). *Bacillus* fermentation of soybeans. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9, 295–299.
- Sarkar, P. K., & Tamang, J. P. (1995). Changes in the microbial profile and proximate composition during natural and controlled fermentations of soybeans to produce kinema. *Food Microbiology*, 12, 317–325.
- Skeggs, Jr., Kahn, J. R., & Shumway, N. P. (1957). The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *The Journal of Experimental Medicine*, 103, 295–299.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, 299, 152–178.
- Siow, R. C. M., & Mann, G. E. (2010). Dietary isoflavones and vascular protection: Activation of cellular antioxidant defenses by SERMs or hormesis? *Molecular Aspects of Medicine*, 31, 468–477.
- Sirtori, C. R., Trioli, M., Bosio, R., Bondioli, A., Calabresi, L., De Vergori, V., et al. (2012). Hypocholesterolaemic effects of lupin protein and pea protein/fibre combinations in moderately hypercholesterolaemic individuals. *The British journal of nutrition*, 107, 1176–1183.
- Sulaiman, S. F., Sajak, A. A. B., & Ooi, K. L. (2011). Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 506–515.
- Suliman, M. A., Hassan, A. B., Osman, G. A., El Tyeb, M. M., El Khalil, E. A. I., El Tinay, A. H., et al. (2008). Changes in total protein digestibility, fractions content and structure during cooking of *Lentil cultivars*. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7, 801–805.
- Tabera, J., Frias, J., Estrella, I., Villa, R., & Vidal-Valverde, C. (1995). Natural fermentation of lentils. Influence of time, concentration and temperature on protein content, trypsin inhibitor activity and phenolic compound content. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 201, 587–591.
- Taku, K., Umegaki, K., Sato, Y., Taki, Y., Endoh, K., & Watanabe, S. (2007). Soy isoflavones lower serum total and LDL cholesterol in humans: A meta-analysis of 11 randomized controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 1148–1156.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113–4117.
- Wang, H. L., & Hesseltine, C. W. (1981). Use of microorganisms cultures: Legume and cereal products. *Food Technology*, 35, 79–83.
- World Health Organization (2009). *Global health risks: Mortality and burden of disease attributable to selected major risks*. Geneva: WHO.
- World Health Organization (2011). *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*. Geneva: WHO.
- Wu, C. H., & Chou, C. C. (2009). Enhancement of aglycone, vitamin K2 and superoxide dismutase activity of black soybean through fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715 at different temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10695–10700.
- Yagoub, A. A., Mohamed, E. B., Ahmed, A. H. R., & El Tinay, A. H. (2004). Study of fururndu, a traditional Sudanese fermented reselle (*Habiscus sabdariffa* L.) seed: Effect on *in vitro* protein digestibility, chemical composition and functional properties of the total proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6143–6150.



#### **Publicación IV. La fermentación mejora el contenido de compuestos bioactivos en extractos de judía.**

Rocío I. Limón, Elena Peñas, M. Inés Torino, Cristina Martínez-Villaluenga, Montserrat Dueñas, Juana Frias. Fermentation enhances the content of bioactive compounds in kidney bean extracts. *Food Chemistry*, **2015**, 172:343-352.

##### **RESUMEN**

En este trabajo se investigó la influencia de la fermentación en estado sólido (SSF) o líquido (LSF) durante 48 y 96 h en la producción de extractos hidrosolubles de judía. La SSF se llevó a cabo con *B. subtilis*, mientras que LSF se realizó mediante fermentación natural o empleando *L. plantarum* como cultivo iniciador. La SSF condujo a un aumento de ácidos fenólicos y una disminución de catequinas y flavonoles, mientras que la LSF causó una disminución de ácidos hidroxibenzoicos, catequinas, flavanonas y flavonoles, y un aumento de derivados hidroxicinámicos. Los extractos obtenidos mediante SSF mostraron un alto contenido de compuestos fenólicos solubles (31-36 mg/g) y una elevada actividad antioxidante (508-541 µg Trolox equivalentes/g), mientras que los extractos obtenidos mediante LSF exhibieron potencial actividad antihipertensiva debido a su elevado contenido de GABA (6,8-10,6 mg/g) y a su alta actividad inhibidora de ECA (> 90%). Por lo tanto, la fermentación puede ser considerada un proceso atractivo para obtener ingredientes bioactivos a partir de judías, y su incorporación en la formulación de alimentos funcionales aumentaría su valor añadido.

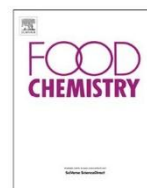






Contents lists available at ScienceDirect

## Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

# Fermentation enhances the content of bioactive compounds in kidney bean extracts



Rocio I. Limón<sup>a</sup>, Elena Peñas<sup>a</sup>, M. Inés Torino<sup>b</sup>, Cristina Martínez-Villaluenga<sup>a</sup>, Montserrat Dueñas<sup>c</sup>, Juana Frias<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

<sup>b</sup> CCT CERELA-CONICET, Chacabuco 145, 4000 SM Tucumán, Argentina

<sup>c</sup> Research Group on Polyphenols, Nutrition and Bromatology Unit, Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Campus Miguel Unamuno, 37007 Salamanca, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 18 June 2014

Received in revised form 8 August 2014

Accepted 16 September 2014

Available online 28 September 2014

## Keywords:

Kidney beans

Fermentation

Antioxidants

Antihypertensive compounds

Functional ingredients

## ABSTRACT

The influence of solid (SSF) or liquid state fermentation (LSF) for 48 and 96 h on the production of water soluble extracts from kidney beans was investigated. SSF was carried out by *Bacillus subtilis*, whilst LSF was performed either by natural fermentation (NF) or by *Lactobacillus plantarum* strain (LPF). SSF extracts showed high soluble phenolic compound content (31–36 mg/g) and antioxidant activity (508–541 µg trolox equivalents/g), whilst LSF extracts exhibited potential antihypertensive activity due to their large  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) content (6.8–10.6 mg/g) and angiotensin converting enzyme inhibitory (ACEI) activity (>90%). Therefore, fermentation can be considered as a valuable process to obtain bioactive ingredients from kidney beans, which could encourage their utilisation in the formulation of added-value functional foods.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Chronic diseases such as cancer, diabetes, obesity and cardiovascular diseases (CVD) represent the leading cause of mortality, accounting for around 36 billion deaths worldwide each year (WHO, 2013). Scientific evidence has demonstrated that diet has an essential role in their prevention and management.

Consumption of traditional fermented legumes has been shown to have protective effects against CVD (Crujeiras, Parra, Abete, & Martínez, 2007) and therefore, there is a growing interest to promote their production. Fermentation of legumes brings several advantages since it decreases the non-nutritional factors, improves nutrient digestibility and reduces their allergenicity (Frias, Song, Martínez-Villaluenga, Gonzalez de Mejia, & Vidal-Valverde, 2008; Starzyńska-Janiszewska, Stodolak, & Mickowska, 2013). This technological process also improves the biological activity of legumes, as microbial enzymes bring about the bioconversion of polyphenols into more biologically active compounds (Lee, Lo, & Pan, 2013) and can release bioactive peptides from legume proteins (Martínez-Villaluenga et al., 2012; Torino et al., 2013). Although soybean is the most utilised legume for fermentation, there are

other unexplored legumes with a large potential for the production of fermented foods that might contribute to the prevention of CVD.

Solid and liquid state fermentations (SSL and LSF, respectively) are current processing techniques traditionally used to preserve and to enhance the nutritional quality and health promotion properties of legumes (Juan & Chou, 2010; Torino et al., 2013). The type of microorganism involved in the fermentation process plays a key role in the fermentation process. *Bacillus subtilis* has been used as a starter strain for manufacturing soybean fermented products with potential antihypertensive, antithrombotic and fibrinolytic properties (Murakami, Yamanaka, Ohnishi, Fukayama, & Yoshino, 2012; Omura, Hitosugi, Zhu, Ikeda, & Maeda, 2005). Recently, Dueñas et al. (2012) have reported that *B. subtilis* enhance the production of isoflavone aglycones, thus improving the antioxidant activity of fermented soybean.

Lactic acid bacteria (LAB) have also been traditionally used for legume fermentation since they are naturally present in legume grains. There is a strong consensus that fermentation of legumes with LAB strains, such as those of *Lactobacillus* genera, can favour the production of bioactive compounds, providing health benefits beyond basic nutrition (Frias et al., 2008; Savijoki, Ingmer, & Varmanen, 2006; Song, Frias, Martínez-Villaluenga, Vidal-Valverde & Gonzalez de Mejia, 2008; Torino et al., 2013). Fermentation of cowpeas with *Lactobacillus plantarum* led to changes in phenolic composition and improved antioxidant activity (Dueñas, Fernández, Hernández, Estrella, & Muñoz, 2005). It has recently

\* Corresponding author. Tel.: +34 912587510; fax: +34 915644853.

E-mail address: [frias@ictan.csic.es](mailto:frias@ictan.csic.es) (J. Frias).



been reported that LAB fermentation of adzuki beans and lentils allows accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), a blood pressure regulator (Liao, Wang, Shyu, Yu, & Ho, 2013; Torino et al., 2013). In addition, soybean milk fermented with LAB exhibited antioxidant, antihypertensive, antiinflammatory (Martínez-Villaluenga et al., 2012) and anti-obesity properties (Lee et al., 2013).

Total world grain bean production increased by 3% in 2005 to 23.5 million tons (FAO Statistical Yearbook, 2013) and although they are the most important grain legume in direct human consumption in the world (Broughton et al., 2003), their industrial utilisation for added-value food ingredients is limited. Therefore, fermentation represents a strategic approach for diversifying derived bean products to a current market demanding novel functional foods with CVD preventive properties.

This work investigated solid and liquid state fermentations in kidney beans for the production of water-soluble extracts with potential antihypertensive effects (angiotensin I converting enzyme inhibitory – ACEI – activity and GABA content), phenolic composition and antioxidant activity. The evolution of microbial populations and pH in fermented beans was also studied. Results derived from this work will provide valuable information on the composition and bioactivity of kidney bean fermented ingredients in order to develop novel functional foods.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Seeds

Kidney beans (*Phaseolus vulgaris* var. Pinto) were provided by Semillas Iglesias S.A. (Salamanca, Spain). Seeds were washed with distilled water and dried at 55 °C for 24 h before fermentation.

### 2.2. Preparation of microbial cultures

*B. subtilis* CECT 39<sup>T</sup> (ATCC 6051) and *L. plantarum* CECT 748<sup>T</sup> (ATCC 14917) were purchased from the Spanish Type Culture Collection (CECT). Cultures were stored and activated for solid or liquid fermentations as described in Torino et al. (2013).

### 2.3. Fermentation of kidney beans

#### 2.3.1. Solid state fermentation (SSF)

Cracked beans (100 g) were suspended in sterile distilled water (1:2, w/v) and autoclaved at 121 °C for 15 min. Sterile cracked seeds (30 g) were homogeneously inoculated with 5% (v/v) *B. subtilis* ( $10^5$  CFU/g), mixed, aseptically distributed over Petri dishes and incubated for 96 h at 30 °C and 90% humidity in a climatic chamber (Snijders-Scientific, Tiburg, Netherlands). SSF samples were withdrawn at 0, 48 and 96 h to determine changes in bacterial populations and pH values. Fermented samples were autoclaved at 121 °C for 15 min and freeze-dried. SSF water-soluble extracts were prepared by suspending freeze-dried fermented beans in distilled water (1:10, w/v) and kept in continuous agitation for 1 h at room temperature. Extracts were centrifuged at 14,534g for 15 min at 10 °C (Sorval, model RC 6+). Supernatants were filtered through Whatman No. 1 paper, freeze-dried and stored under vacuum at –20 °C until further analysis.

#### 2.3.2. Liquid state fermentations (LSF)

Bean flour (200 g) was suspended in sterile distilled water (1:5 w/v). Fermentations were carried out in a 3 L BioFlo/celligen 115 fermenter (New Brunswick Scientific Co., INC, Edison, NJ) either spontaneously by the indigenous microbiota present on seeds (natural fermentation, NF) or with 2% (v/v) of *L. plantarum* suspension

( $10^8$  CFU/mL) (LPF), at 37 °C and continuous agitation at 350 rpm for 96 h. Samples were withdrawn at 0, 48 and 96 h to determine changes in bacterial populations and pH. Fermented samples were centrifuged (14,534g, 15 min, 6 °C) and supernatants were freeze-dried and stored under vacuum at –20 °C for further analysis.

### 2.4. Microbiological analysis

Fermentations were monitored by withdrawing samples at 0, 48 and 96 h of fermentation using plate counts to determine changes in viable cells. *B. subtilis* were counted in BHI broth supplemented with 1.5% (w/v) agar, after incubation at 30 °C for 48 h. LAB were counted in MRS agar after incubation at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 72 h. Cell counts were expressed as log<sub>10</sub> CFU/g for *B. subtilis* and log<sub>10</sub> CFU/mL for LAB.

### 2.5. Chemical analysis

#### 2.5.1. Proteolytic activity

Proteolytic activity in SSF and LSF bean extracts was assessed by measuring the free amino groups following the method reported by Martínez-Villaluenga et al. (2012). Results were expressed as mg peptides/g extract.

#### 2.5.2. GABA content

The extraction of GABA in SSF and LSF extracts and its quantification by HPLC was carried out as in Torino et al. (2013). Results were expressed in mg GABA/g extract.

#### 2.5.3. Soluble phenolic compounds (SPC)

The content of SPC in bean extracts was determined as in Torino et al. (2013). SPC were quantified by external calibration using gallic acid (Sigma–Aldrich). Results were expressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/g extract.

#### 2.5.4. Extraction and analysis of phenolic compounds by HPLC–DAD–ESI/MS

Water-soluble bean extracts were macerated in methanol/tri-fluoroacetic acid (1<sup>0</sup>/<sub>000</sub>):water 80:20 (v/v) for 1 h according to Dueñas, Hernández, and Estrella (2007) and analysed as follows:

**2.5.4.1. Non anthocyanin phenolic compounds.** The extracts were analysed using a Hewlett–Packard 1100MS chromatograph (Agilent Technologies) equipped with a quaternary pump, diode array detector coupled to an Hewlett Packard Chem Station (rev. A0504) data-processing station, following the method described by Barros, Dueñas, Carvalho, Ferreira, and Santos-Buelga (2012). A Waters Spherisorb S3 ODS-2 C8, 3  $\mu$ m (4.6 mm  $\times$  150 mm) column at 35 °C was used. Solvents were (A) 0.1% formic acid in water, and (B) 100% HPLC grade acetonitrile. The elution gradient established was: 15% for 5 min, 15–20% B over 5 min, 20–25% B over 10 min, 25–35% B for 10 min, 35–50% B for 10 min. The flow-rate was 0.5 ml/min. Double online detection was carried out in the DAD using 280 nm and 370 nm as preferred wavelengths. Mass spectrometer (MS) connected to the HPLC system via the DAD cell outlet was used and detection was performed in an API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) equipped with an ESI (Electrospray Ionisation) source, triple quadrupole-ion trap mass analyser and controlled by the Analyst 5.1 software. The settings were: zero grade air as the nebuliser gas (30 psi), turbo gas for solvent drying (400 °C, 40 psi), nitrogen served as the curtain (20 psi) and collision gas (medium). The quadrupoles were set at unit resolution. The ion spray voltage was set at –4500 V in the negative mode. The MS detector was programmed to perform a series of two consecutive modes: enhanced mass spectrum (EMS) and enhanced product ion (EPI) analysis. EMS was employed to show



full scan spectra, to give an overview of all the ions in sample. Settings used were: declustering potential (DP) –45 V, entrance potential (EP) –6 V, collision energy (CE) –10 V. Spectra were recorded in negative ion mode between  $m/z$  100 and 1000. EPI mode was further performed in order to obtain the fragmentation pattern of the parent ion(s) of the previous experiment using the following parameters: DP –50 V, EP –6 V, CE –25 V, and collision energy spread (CES) 0 V.

The phenolic compounds were characterised according to their UV and mass spectra and retention times, and comparison with authentic standards when available. For quantitative analysis, calibration curves were prepared by injection of known concentrations of different standard compounds. Aldaric, quinic and hexosides derivatives of *p*-coumaric, ferulic and sinapic acids were quantified by the curves of the corresponding free acids; (+)-catechin-hexoside and (+)-catechin-acylhexoside based on the curve of (+)-catechin; flavonols, derivatives of kaempferol, quercetin and isorhamnetin by the curves of kaempferol-3-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-glucoside and isorhamnetin 3-*O*-rutinoside, respectively. Flavanones, eridictyol derivatives based on the curve of naringenin; and naringenin and hesperetin derivatives as naringenin and hesperitin, respectively. Results were expressed as  $\mu\text{g}$  of phenolic compound/g of extract.

**2.5.4.2. Anthocyanins.** The extracts were analysed in an AQUA<sup>®</sup> HPLC system (Phenomenex) equipped with a reverse phase C18 column (5  $\mu\text{m}$ , 150 mm  $\times$  4.6 mm i.d) at 35 °C according to García-Marino, Hernández-Hierro, Rivas-Gonzalo, and Escribano-Bailón (2010). Detection was carried out at 520 nm. MS was performed in the same equipment described above. Zero grade air served as the nebuliser gas (40 psi) and turbo gas (600 °C) for solvent drying (50 psi). Nitrogen served as the curtain (100 psi) and collision gas (high). Both quadrupole units were set at unit resolution. The ion spray voltage was set at 5000 V in the positive mode. EMS and ESI methods were used for acquisition of full scan spectra and fragmentation patterns of the precursor ions, respectively. Setting parameters used for EMS mode were: declustering potential (DP) 41 V, entrance potential (EP) 7.5 V, collision energy (CE) 10 V, and parameters for EPI mode were: DP 41 V, EP 7.5 V, CE 10 V, and collision energy spread (CES) 0 V.

For the quantitative analysis of anthocyanin a calibration curve was obtained by injection of different concentrations of cyanidin 3-*O*-glucoside, malvidin 3-*O*-glucoside and pelargonidin 3-*O*-glucoside. The results were expressed in  $\mu\text{g}$  per g of dry weight (dw).

#### 2.5.5. SDS-PAGE protein profile

Proteins from SSF and LSF extracts were separated by SDS-PAGE under reducing conditions according to Limón, Peñas, Martínez-Villaluenga, & Frias (2014).

#### 2.5.6. Antioxidant activity

Oxygen Radical Absorbance Capacity was determined in the water-soluble bean extracts by fluorescence measurement (ORAC-FL) as described by Torino et al. (2013). Trolox (Sigma) was used as standard. Results were expressed as mg Trolox equivalents (TE)/g extract.

#### 2.5.7. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity (ACEI activity)

ACEI activity was determined according to Martínez-Villaluenga et al. (2012). IC<sub>50</sub> values, defined as the amount of sample that inhibits the activity of ACE by 50%, were determined by sigmoidal dose–response curves in GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

#### 2.6. Statistical methods

SSF and LSF processes were independently performed in triplicate. Chemical analyses of each batch were carried out in duplicate, and each determination was analysed three times. Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) using Statgraphics Centurion XVI software, version 16.1.17 (Statistical Graphics Corp, Rockville, MD, USA). Significant differences between samples were determined by using the least significant difference (LSD) test at  $P \leq 0.05$  probability level. Principal components analysis (PCA) was performed with covariance matrix obtained by data transformation using MultBiplot software (Vicente-Villardón, 2010).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Evolution of pH and microbial growth during fermentation

Changes of pH during fermentation of beans at the different studied conditions are shown in Table 1. During SSF, pH significantly increased ( $P \leq 0.05$ ) from 6.3 to 7.0, which could be attributed to the production of ammonia during kidney bean fermentation by *B. subtilis* (Allagheny, Obanu, Campbell-Platt, & Owens, 1996). The population of *B. subtilis* increased sharply during the first 48 h (~3.14 log units) and no further changes were observed. Bacterial growth was reflected in the proteolytic activity, measured as the amount of peptides released during fermentation, which increased significantly from 48 h (5.25 mg/g) to 96 h (29.36 mg/g) (Table 1). The low amount of peptides formed during the first 48 h could be caused by the difficulty of *B. subtilis* proteases to cleave glycoproteins, phosphoproteins or domains containing a high number of disulphide bridges (Weng & Chen, 2010).

In the course of LSF, pH gradually decreased significantly ( $P \leq 0.05$ ) for the first 48 h, from 6.6 to 4.3 and 3.7 in NF96 and LPF96, respectively (Table 1) due to the production of organic acids

**Table 1**  
pH values, cell growth, proteolytic activity, GABA and soluble phenolic content in water-soluble extracts obtained from kidney beans by solid and liquid state fermentations.

	Fermentation time (h)	pH	Log <sub>10</sub> CFU/g <sup>a</sup>	Peptides (mg/g)	GABA (mg/g)	Soluble phenolic content (mg/g)
SSF	0	6.30 ± 0.07 <sup>a</sup>	5.73 ± 0.03 <sup>a</sup>	–	3.20 ± 0.14 <sup>a</sup>	15.89 ± 0.56 <sup>a</sup>
	48	6.62 ± 0.12 <sup>b</sup>	8.80 ± 0.12 <sup>b</sup>	5.25 ± 0.43 <sup>a</sup>	2.61 ± 0.18 <sup>b</sup>	31.08 ± 0.86 <sup>b</sup>
	96	7.09 ± 0.03 <sup>c</sup>	8.21 ± 0.15 <sup>b</sup>	29.36 ± 0.68 <sup>b</sup>	2.69 ± 0.23 <sup>b</sup>	35.93 ± 0.69 <sup>c</sup>
NF	0	6.57 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.01 ± 0.02 <sup>A</sup>	–	2.27 ± 0.17 <sup>A</sup>	20.68 ± 1.04 <sup>BC</sup>
	48	4.26 ± 0.01 <sup>B</sup>	8.80 ± 0.17 <sup>D</sup>	160.54 ± 14.04 <sup>C</sup>	7.54 ± 0.16 <sup>C</sup>	21.19 ± 0.80 <sup>CD</sup>
	96	4.29 ± 0.01 <sup>B</sup>	8.77 ± 0.13 <sup>D</sup>	113.67 ± 32.62 <sup>B</sup>	10.59 ± 0.52 <sup>E</sup>	20.16 ± 0.62 <sup>B</sup>
LPF	0	6.63 ± 0.03 <sup>C</sup>	7.04 ± 0.11 <sup>C</sup>	–	2.27 ± 0.17 <sup>A</sup>	20.68 ± 1.04 <sup>BC</sup>
	48	3.76 ± 0.12 <sup>A</sup>	9.05 ± 0.05 <sup>E</sup>	157.38 ± 11.85 <sup>C</sup>	6.76 ± 0.28 <sup>B</sup>	21.96 ± 0.54 <sup>D</sup>
	96	3.72 ± 0.03 <sup>A</sup>	5.92 ± 0.03 <sup>B</sup>	98.65 ± 11.11 <sup>A</sup>	9.90 ± 0.10 <sup>D</sup>	17.79 ± 0.08 <sup>A</sup>

Values are means of three independent fermentation batches ± standard deviation. Lower-case superscripts indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ) among solid state fermentation samples (SSF). Upper-case superscripts indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ) among liquid state fermentation samples (NF, natural fermentation or LPF, fermentation with *L. plantarum*).

<sup>a</sup> Log<sub>10</sub> CFU/g for SSF or Log<sub>10</sub> CFU/mL for NF and LPF.



by LAB during fermentation (Schindler et al., 2012). The initial population of LAB in raw beans was very low (1.01 CFU/ml) and it increased significantly during NF, reaching counts of 8.8 log CFU/ml after 48 h, which remained almost constant to the end of the fermentation (Table 1). LAB counts increased from 7.0 to 9.1 log CFU/mL after 48 h and suffered a significant ( $P \leq 0.05$ ) reduction at the end of fermentation (5.9 log CFU/mL). When colonies from MRS plates were subjected to microscopy analysis, bacilli morphologically corresponding to *L. plantarum* were observed, indicating that the starter added led the fermentation process. The loss of viability of *L. plantarum* after 96 h was previously observed by our group during induced lentil fermentation (Torino et al., 2013). It is known that organic acids released during fermentation exert an inhibitory effect on microbial growth due to an increase in the amount of protons that acidifies the cytoplasm and inhibits many metabolic functions (Lambert & Strattford, 1999). It has been shown that the growth of *L. plantarum* is inhibited when the internal pH reaches 4.6–4.8, corresponding to external cellular pH values of  $\sim 3$  (McDonald, Fleming, & Hassan, 1990). These findings could explain the loss of viability of *L. plantarum* observed in our study after 96 h (pH 3.7).

LAB counts were consistent with pH values in NF and LPF. Faster acidification was observed in LPF compared to NF due to the higher LAB population. Growth of the LAB population in LSF after 48 h was accompanied by a noticeable increase in the proteolytic activity and, as a result, significantly higher concentrations of peptides were found ( $\sim 160$  mg/g extract) (Table 1). However, peptide content was significantly reduced ( $P \leq 0.05$ ) after 96 h in both LSF. This effect could be attributed to the microbial utilisation of peptides as a nitrogen source.

### 3.2. GABA content in bean extracts

GABA contents in water-soluble extracts are also compiled in Table 1. SSF led to a decrease in GABA content ( $\sim 18\%$ ) irrespective of fermentation time. Unlike SSF, NF and LPF processes caused a significant ( $P \leq 0.05$ ) GABA accumulation. The extent of this increase depended on the type of fermentation: NF led to significantly ( $P \leq 0.05$ ) higher GABA levels than LPF (10.6 vs. 9.9 mg/g for NF96 and LPF96, respectively). Similar GABA accumulation was reported in adzuki bean milk fermented with *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus rhamnosus* (Liao et al., 2013). These results indicate that effects of fermentation on GABA content are due to the type of microorganism involved in the process. GABA is a non-protein amino acid produced from L-glutamic acid by glutamic acid decarboxylase enzyme (GAD). *B. subtilis* seems to have a weak capacity to produce GABA, mostly when compared with other microorganisms such as LAB (Park & Oh, 2006). These findings are in agreement with the low GABA content observed in SSF bean extracts in this work. In addition, the thermal treatment of cracked seeds during autoclaving used in the SSF process would inactivate endogenous GAD activity from beans, contributing to the reduced GABA concentration observed in SSF extracts. On the contrary, the GABA accumulation observed in LSF (Table 1) suggests that LAB strains stimulate the production of GABA during bean fermentation. It has been previously shown that many LAB strains, including *L. plantarum*, are potential GABA producers (Di Cagno et al., 2010), since they harbour the gene encoding GAD enzyme (Ko, Lin, & Tsai, 2013). It can be postulated that the endogenous bean GAD would be in part responsible for the GABA increase observed during LSF, since previous studies have revealed a rapid plant GAD activation in response to mechanical manipulation, anaerobic conditions and low pH (Akihiro et al., 2008). The higher GABA content found in NF compared to LPF extracts could be attributed to the higher number of LAB strains producing GAD in NF and also to the different pH of both fermentations. pH seems to play a crucial

role in GABA production by LAB. It has been reported that *L. plantarum* DSM19463 (DSMZ-BP/7 0906; formerly *L. plantarum* C48) synthesised the maximum GABA concentration at pH 6.0 (Di Cagno et al., 2010). The acidic pH observed in LSF in this work could be one of the causes of the decreased GAD activity and, consequently, the low rate of GABA production.

It is well known that GABA has a blood pressure-lowering effect in animals and humans (Inoue et al., 2003) and also acts as a strong secretagogue of insulin from the pancreas, potentially preventing diabetes (Adeghate & Ponery, 2002). Therefore, there is a growing interest to develop GABA-enriched functional foods and fermentation of beans by LAB could constitute an attractive approach to achieve this purpose.

### 3.3. Content of soluble phenolic (SPC) compounds in bean extracts

Due to the potential positive effects of phenolic compounds and their metabolites, they are the subject of many ongoing research studies. Polyphenols are natural antioxidants, which may protect against multiple chronic diseases (Del Rio et al., 2013) and legumes are considered a rich source of these compounds. SPC concentration varied in fermented beans depending on the fermentation conditions (Table 1). SSF resulted in a significant ( $P \leq 0.05$ ) increase in SPC after 48 and 96 h (96 and 126%, respectively), whilst no significant ( $P \geq 0.05$ ) changes or a slight decrease was observed at the end of LSF fermentations. The increase in SPC after SSF could be related to the production of  $\beta$ -glucosidases by *B. subtilis*. This enzyme hydrolyses  $\beta$ -glucosidic bonds of several phenolic compounds occurring in a conjugated form (phenolic glucosides) to the corresponding phenolic aglycones, increasing the concentration of free polyphenols (Georgetti et al., 2009). In fact, the SPC content observed after SSF is within the range of values reported after fermentation of soybean by *B. subtilis* TN51 (Dajanta, Apichartsrangkoon, & Chukeatirote, 2011). Our results indicate that microbial  $\beta$ -glucosidase activity was higher in SSF than in the LSF process. These differences could be attributed to the different fermentation conditions. Sestelo, Poza, and Villa (2004) reported that the activity of  $\beta$ -glucosidase produced by *L. plantarum* USCI varied greatly depending on the pH in the medium, with the optimal pH range for enzyme activity being from 4.5 to 7.5, while pH values below 4 produced enzyme inactivation. These findings could explain the low modification of SPC content during LSF, due to inactivation of this enzyme at low pH values (3.7). The lack of changes in SPC observed in LSF water-soluble extracts is consistent with our previous findings in lentils fermented spontaneously or by *L. plantarum* (Torino et al., 2013).

It is noteworthy that the solvent used to extract bioactive compounds is determinant for the content and composition of the compounds extracted. In the present work, water was used as solvent to obtain fermented bean extracts and, therefore, only water-soluble compounds were extracted. Non-fermented water-soluble extracts contained 16–21 mg GAE/g, results that are in agreement with those reported for water soluble extracts from fermented black soybean (Juan & Chou, 2010) and fermented lentils (Torino et al., 2013).

### 3.4. Phenolic composition of bean extracts

Tables 2 and 3 show the phenolic composition of SSF and LSF water-soluble extracts. Several phenolic compounds were identified in non-fermented kidney bean extracts (SSF0). Among them, hydroxycinnamic acids were the major group of phenolic compounds found, representing  $\sim 50\%$  of the total content (Table 2). These results are in agreement with those reported by Luthria and Pastor-Corrales (2006) for pinto beans. *p*-Coumaric, ferulic and sinapic acids linked to aldaric and quinic acids were the



**Table 2**Concentration of non-anthocyanin phenolic compounds ( $\mu\text{g/g}$ ) in water-soluble extracts obtained from kidney bean by solid state fermentation.

Compounds	SSF0	SSF48	SSF96
Feruloyl hexoside acid	$1.26 \pm 0.03^a$	$42.42 \pm 3.68^b$	$40.67 \pm 3.07^b$
(+)-Catechin O-hexoside	$2.76 \pm 0.15^b$	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Feruloyl aldaric acid	$0.29 \pm 0.05^a$	$8.27 \pm 2.02^b$	$9.84 \pm 0.19^b$
Feruloyl hexoside acid	$0.80 \pm 0.00^a$	$8.60 \pm 0.14^b$	$8.50 \pm 0.00^b$
(+)-Catechin O-acylhexoside	nd	nd	nd
Feruloyl aldaric acid	$0.79 \pm 0.04^a$	$15.31 \pm 1.41^b$	$16.95 \pm 0.06^b$
Feruloyl aldaric acid	$1.04 \pm 0.07^a$	$16.57 \pm 0.42^b$	$33.35 \pm 0.61^c$
Sinapoyl aldaric acid	nd	nd	nd
(+)-Catechin	$7.88 \pm 1.59^b$	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Feruloyl aldaric acid	$2.72 \pm 0.12^a$	$31.23 \pm 1.93^b$	$32.12 \pm 3.05^b$
p-Hydroxybenzoic acid	$3.48 \pm 0.10^a$	$20.65 \pm 1.45^b$	$21.80 \pm 1.54^b$
Eriodictyol hexoside	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
trans-p-Coumaroyl derivative acid	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	$10.73 \pm 3.77^b$
trans p-Coumaroyl acylhexoside acid	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Sinapoyl methylaldaric acid	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Sinapoyl methylaldaric acid	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Naringenin derivative	$1.26 \pm 0.22^a$	$1.47 \pm 1.24^a$	$2.18 \pm 0.49^a$
Hesperetin glucuronide-hexoside	$3.50 \pm 0.05^a$	$6.61 \pm 1.37^a$	$5.14 \pm 1.63^a$
trans p-coumaric acid	$4.19 \pm 0.32^c$	$2.40 \pm 0.44^b$	$0.41 \pm 0.23^a$
Naringenin	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Ferulic acid	$10.56 \pm 2.46^a$	$63.50 \pm 2.82^b$	$69.98 \pm 13.75^b$
Feruloyl quinic acid	$1.36 \pm 0.42^c$	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Quercetin-3-O-glucoside	$1.27 \pm 0.07^b$	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Quercetin-O-acylhexoside	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Kaempferol-3-O-rutinoside	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Eriodictyol hexoside	$1.35 \pm 0.14^b$	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Kaempferol-3-O-glucoside	$0.63 \pm 0.01^c$	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Quercetin-O-hexoside	$0.43 \pm 0.05^b$	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Isorhamnetin-O-hexoside	$0.03 \pm 0.02^a$	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Eriodictyol-O-acyl hexoside	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Isorhamnetin-O-acyl hexoside	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Hydroxybenzoic acids	$3.48 \pm 0.10^a$ (7.62%)	$20.65 \pm 1.45^b$ (9.51%)	$21.80 \pm 1.54^b$ (8.66%)
Hydroxycinnamic compounds	$23.03 \pm 3.04^a$ (50.48%)	$188.32 \pm 4.33^b$ (86.76%)	$222.56 \pm 9.87^c$ (88.43%)
Catechins	$10.64 \pm 1.74^b$ (23.32%)	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Flavanones	$6.11 \pm 0.41^a$ (13.39%)	$8.08 \pm 2.61^a$ (3.72%)	$7.32 \pm 1.14^a$ (2.91%)
Flavonols	$2.37 \pm 0.15^b$ (5.18%)	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Total	$45.61 \pm 1.96^a$	$217.04 \pm 0.28^b$	$251.68 \pm 7.19^c$

Values are means of three independent fermentation batches  $\pm$  standard deviation. Lower-case superscripts indicate significant difference ( $P \leq 0.05$ ) among solid state fermentation samples (SSF).

hydroxycinnamic derivatives identified. Hydroxybenzoic acids such as *p*-hydroxybenzoic acid, were another group of non-flavonoid compounds identified, representing  $\sim 8\%$  in SSF0 extracts. Among flavonoid compounds, catechins were the most abundant ( $\sim 23\%$ ), and (+)-catechin and (+)-catechin-hexoside were the main compounds found in SSF0 extracts. Flavanones ( $\sim 13\%$ ) such as derivatives of hesperetin, naringenin and eriodictyol, and flavonols ( $\sim 5\%$ ) such as glycosides of quercetin and isorhamnetin were also found in SSF0 extracts (Table 2).

Different phenolic compositions were observed in LSF0 extracts (Table 3): catechins ( $\sim 45\%$ ) were the most abundant compounds, followed by hydroxycinnamic derivatives (40%) and flavanones (9.5%). Hydroxybenzoic acids ( $\sim 4\%$ ) and flavonols ( $\sim 1\%$ ) were the groups present at lower concentrations. LSF0 also contained anthocyanins such as derivatives of cyanidin (cyanidin-3-O-glucoside,  $2.09 \pm 0.15 \mu\text{g/g}$ ), pelargonidin (pelargonidin-3-O-glucoside,  $14.53 \pm 1.13 \mu\text{g/g}$ ; pelargonidin-3-O-malonylglucoside,  $0.29 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$ ; and malvidin,  $0.96 \pm 0.06 \mu\text{g/g}$ ) but these compounds were not found in the SSF0 extracts, likely due to their instability to autoclaving treatment during sample preparation. Some of the phenolic compounds identified in SSF0 and LSF0 extracts have also been found in kidney beans (López et al., 2013).

During SSF and LSF fermentations, qualitative and quantitative differences in the identified phenolic compounds were observed (Table 3). *p*-Hydroxybenzoic acids increased markedly (84%) in SSF extracts (Table 2) possibly due to their synthesis from bean

hemicelluloses by *B. subtilis* (Reddy & Krishnan, 2013), whilst the concentration of these compounds underwent a significant ( $P \leq 0.05$ ) diminution during the LSF process, likely caused by the metabolism *p*-hydroxybenzoic acids by LAB decarboxylases (Rodríguez, Landete, de las Rivas, & Muñoz, 2008). The highest reduction ( $\sim 75\%$ ) was found in NF48 extracts, with content significantly ( $P \leq 0.05$ ) lower than that observed in LPF48 and LPF96 samples.

A general increase in the content of hydroxycinnamic compounds was observed in SSF and NF96 extracts. For NF48, LPF48 and LPF96 no significant differences with the corresponding non-fermented extract were found. The content of *trans*-*p*-coumaric acid decreased gradually during SSF (Table 2), whilst it increased during NF and LPF processes, reaching the highest concentration after 96 h ( $3.44$  and  $1.48 \mu\text{g/g}$  in NF and LPF extracts, respectively) (Table 3). The concentration of *trans*-ferulic acid and some of its derivatives increased in SSF and NF extracts (Tables 2 and 3), whilst they decreased significantly ( $P \leq 0.05$ ) in LPF samples (Table 3). The *novo* synthesis of hydroxycinnamic acids such as *p*-coumaric and ferulic acids in fermented legumes has been described previously (Dueñas et al., 2005).

(+)-Catechin content underwent a remarkable decrease in all fermented ingredients, reaching levels under the detection limit in SSF samples (Table 3). The decrease of the catechin monomer could be attributed to the formation of more polymeric

**Table 3**Concentration of non-anthocyanin phenolic compounds ( $\mu\text{g/g}$ ) in water-soluble extracts obtained from kidney beans by in liquid state fermentations.

Compounds	LSF0	NF48	NF96	LPF48	LPF96
Feruloyl hexoside acid	4.06 $\pm$ 1.36 <sup>b</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
(+)-Catechin O-hexoside	14.86 $\pm$ 2.69 <sup>b</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Feruloyl aldaric acid	2.31 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	2.54 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	2.25 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	4.50 $\pm$ 1.28 <sup>b</sup>	11.95 $\pm$ 0.43 <sup>c</sup>
Feruloyl hexoside acid	5.64 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	5.19 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	5.99 $\pm$ 0.95 <sup>b</sup>	2.27 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	9.61 $\pm$ 0.76 <sup>c</sup>
(+)-Catechin O-acylhexoside	23.03 $\pm$ 5.31 <sup>b</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Feruloyl aldaric acid	20.84 $\pm$ 0.56 <sup>c</sup>	24.99 $\pm$ 0.69 <sup>d</sup>	14.11 $\pm$ 1.58 <sup>b</sup>	22.26 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>	4.63 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>
Feruloyl aldaric acid	23.83 $\pm$ 0.69 <sup>ab</sup>	23.21 $\pm$ 2.77 <sup>ab</sup>	23.14 $\pm$ 2.49 <sup>ab</sup>	27.70 $\pm$ 8.25 <sup>b</sup>	13.31 $\pm$ 1.32 <sup>a</sup>
Sinapoyl aldaric acid	69.41 $\pm$ 6.03 <sup>a</sup>	111.18 $\pm$ 1.34 <sup>ab</sup>	189.44 $\pm$ 38.75 <sup>c</sup>	119.84 $\pm$ 2.35 <sup>ab</sup>	147.45 $\pm$ 22.93 <sup>bc</sup>
(+)-Catechin	245.54 $\pm$ 2.92 <sup>d</sup>	8.54 $\pm$ 2.83 <sup>a</sup>	10.07 $\pm$ 1.24 <sup>a</sup>	45.78 $\pm$ 2.93 <sup>b</sup>	66.93 $\pm$ 3.76 <sup>c</sup>
Feruloyl aldaric acid	31.42 $\pm$ 0.47 <sup>c</sup>	5.52 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	13.14 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>	13.24 $\pm$ 0.85 <sup>b</sup>	15.17 $\pm$ 2.93 <sup>b</sup>
p-Hydroxybenzoic acid	24.35 $\pm$ 0.37 <sup>c</sup>	5.89 $\pm$ 1.66 <sup>a</sup>	7.79 $\pm$ 0.33 <sup>ab</sup>	9.20 $\pm$ 1.80 <sup>b</sup>	9.24 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>
Eriodictyol hexoside	12.37 $\pm$ 2.35 <sup>b</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
p-Coumaroyl derivative acid	2.53 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	1.37 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	2.55 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup>	2.34 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>	1.06 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
p-Coumaroyl acylhexoside acid	3.08 $\pm$ 1.02 <sup>c</sup>	1.41 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup>	2.36 $\pm$ 0.17 <sup>bc</sup>	0.66 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.57 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>
Sinapoyl methylaldaric acid	51.57 $\pm$ 8.99 <sup>d</sup>	19.73 $\pm$ 1.05 <sup>bc</sup>	25.78 $\pm$ 6.44 <sup>c</sup>	8.58 $\pm$ 0.26 <sup>ab</sup>	5.92 $\pm$ 1.31 <sup>a</sup>
Sinapoyl methylaldaric acid	20.84 $\pm$ 2.74 <sup>b</sup>	22.64 $\pm$ 1.72 <sup>b</sup>	19.92 $\pm$ 2.70 <sup>b</sup>	9.98 $\pm$ 1.36 <sup>a</sup>	5.32 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>
Naringenin derivative	7.48 $\pm$ 1.08 <sup>b</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Hesperetin glucuronide-hexoside	20.60 $\pm$ 1.56 <sup>d</sup>	17.61 $\pm$ 0.92 <sup>c</sup>	17.84 $\pm$ 1.13 <sup>c</sup>	7.96 $\pm$ 0.84 <sup>b</sup>	3.53 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>
trans p-Coumaric acid	nd <sup>a</sup>	1.47 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	3.44 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>	1.29 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	1.48 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>
Naringenin	18.04 $\pm$ 0.81 <sup>c</sup>	14.78 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	15.30 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Ferulic acid	14.07 $\pm$ 0.56 <sup>c</sup>	21.82 $\pm$ 0.89 <sup>d</sup>	30.73 $\pm$ 2.83 <sup>c</sup>	6.45 $\pm$ 1.16 <sup>b</sup>	5.43 $\pm$ 0.68 <sup>ab</sup>
Feruloyl quinic acid	nd	nd	nd	nd	nd
Quercetin-3-O-glucoside	1.97 $\pm$ 0.62 <sup>c</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Quercetin-O-acylhexoside	2.55 $\pm$ 0.08 <sup>d</sup>	1.18 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	1.31 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	1.67 $\pm$ 0.26 <sup>c</sup>	0.92 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
Kaempferol-3-O-rutinoside	0.54 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Eriodictyol-O-hexoside	nd	nd	nd	nd	nd
Kaempferol-3-O-glucoside	0.34 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	1.57 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	1.83 $\pm$ 0.20 <sup>c</sup>	1.10 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.65 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
Quercetin-O-hexoside	1.29 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Isorhamnetin-O-hexoside	nd	nd	nd	nd	nd
Eriodictyol-O-acyl hexoside	0.67 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Isorhamnetin-O-acyl hexoside	0.53 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Hydroxybenzoic acids	24.35 $\pm$ 0.36 <sup>c</sup> (3.90%)	5.89 $\pm$ 1.66 <sup>a</sup> (2.03%)	7.79 $\pm$ 0.33 <sup>ab</sup> (2.01%)	9.20 $\pm$ 0.60 <sup>b</sup> (3.23%)	9.24 $\pm$ 0.60 <sup>b</sup> (3.05%)
Hydroxycinnamic compounds	249.62 $\pm$ 4.78 <sup>a</sup> (40.02%)	241.07 $\pm$ 3.02 <sup>a</sup> (82.94%)	332.84 $\pm$ 44.60 <sup>b</sup> (86.01%)	219.12 $\pm$ 14.97 <sup>a</sup> (76.93%)	221.91 $\pm$ 31.35 <sup>a</sup> (73.19%)
Catechins	283.43 $\pm$ 0.30 <sup>d</sup> (45.44%)	8.54 $\pm$ 2.83 <sup>a</sup> (2.94%)	10.07 $\pm$ 1.24 <sup>a</sup> (2.60%)	45.78 $\pm$ 2.93 <sup>b</sup> (16.07%)	66.93 $\pm$ 3.76 <sup>c</sup> (22.08%)
Flavanones	59.15 $\pm$ 4.24 <sup>c</sup> (9.48%)	32.39 $\pm$ 0.80 <sup>b</sup> (11.14%)	33.14 $\pm$ 1.71 <sup>b</sup> (8.56%)	7.96 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup> (2.79%)	3.53 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup> (1.16%)
Flavonols	7.22 $\pm$ 0.32 <sup>c</sup> (1.16%)	2.76 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup> (0.95%)	3.14 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup> (0.81%)	2.77 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup> (0.97%)	1.57 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup> (0.52%)
Total	623.77 $\pm$ 8.68 <sup>c</sup>	290.65 $\pm$ 2.68 <sup>a</sup>	368.99 $\pm$ 48.15 <sup>b</sup>	284.83 $\pm$ 14.95 <sup>a</sup>	303.19 $\pm$ 36.25 <sup>a</sup>

Values are means of three independent fermentation batches  $\pm$  standard deviation. Lower-case superscripts indicate significant difference ( $P \leq 0.05$ ) among liquid state fermentation samples (NF, natural fermentation or LPF, fermentation with *L. plantarum*).

procyanidins during fermentation, which were not detected in the analytical conditions used. (+)-Catechin-O-hexoside was not detected in SSF and LSF ingredients (Tables 2 and 3).

No significant differences in the flavanone contents were observed in SSF extracts compared to control (Table 2). However, the concentration of this group of compounds decreased during LSF (45% in NF96 and 94% in LPF96) (Table 3).

A similar behaviour was observed with flavonol concentration, which decreased to 78% in LPF96 extract compared to control (Table 3). These compounds disappeared during SSF (Table 2). A pronounced decrease in flavanones and flavonol content after fermentation of soybean by *B. subtilis* has also been recently reported (Dueñas et al., 2012).

Anthocyanins were not detected in any of the studied extracts, likely due to their degradation during fermentation of kidney beans.

### 3.5. SDS-PAGE profile of bean extracts

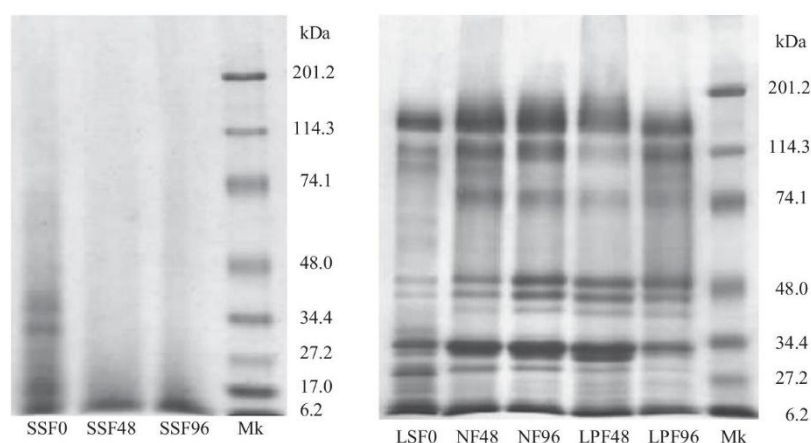
The protein profile of SSF and LSF water-soluble bean extracts is illustrated in Fig. 1. SSF0 showed a low number of protein bands in the electropherogram, possibly due to protein denaturation during the autoclaving of cracked seeds prior to fermentation that caused

a reduction in protein solubility. A complete absence of protein bands was observed in SSF extracts obtained after 48 and 96 h of fermentation. This effect can be attributed to the severe thermal treatment during autoclaving instead of the hydrolysis of bean proteins by *B. subtilis*. These results match with the low concentration of peptides released during fermentation (Table 1). The lack of protein bands during SDS-PAGE analysis under reducing conditions of natto has also been observed by Weng and Chen (2010).

Regarding LSF extracts, LSF0 exhibited a complex protein profile, showing protein bands ranging from 6 to 150 kDa, similar to that previously reported for White and Pinto beans (Limón et al., 2014; Rui, Boye, Ribereau, Simpson, & Prasher, 2011). The major protein bands showed MW of about 44, 47 and 53 kDa corresponding to individual subunits of vicilin (Rui et al., 2011). Another intense band of ~115 kDa seems to be a large protein or a protein aggregate stabilised by forces other than disulphide bonds, since  $\beta$ -mercaptoethanol was unable to hydrolyse the structure completely. The 31 kDa band probably belongs to phytohemagglutinin, as reported previously by Rui et al. (2011).

During LSF, scarce protein hydrolysis was observed. Only two kidney bean proteins of 95 and 29 kDa were hydrolysed and peptides with MW  $\leq$  6 kDa (not retained in the gel) were probably formed.





**Fig. 1.** SDS–PAGE profiles of water-soluble extracts obtained from kidney beans by solid and liquid state fermentations. SSF0, SSF48 and SSF96: water-soluble extracts obtained by solid state fermentation at 0, 48, and 96 h, respectively; LSF0: water-soluble extracts obtained by liquid state fermentation at 0 h; NF48 and NF96: water-soluble extracts obtained by natural fermentation at 48 and 96 h, respectively; LPF48 and LPF96: water-soluble extracts obtained by fermentation with *L. plantarum* at 48 and 96 h, respectively; Mk: prestained molecular weight marker.

### 3.6. Antioxidant activity of bean extracts

One of the challenges of legume fermentation is the production of ingredients with enhanced antioxidant activity that may protect against oxidative stress. Antioxidant activity of water-soluble extracts obtained from fermented beans was determined by ORAC-FL assay, one of the most referenced methods to compare antioxidant activity among foods. SSF extracts exhibited the highest antioxidant activity that rose from 170 mg TE/g in SSF0 extracts to 540 and 508 mg TE/g in SSF48 and SSF96 extracts, respectively (Fig. 2). These values were somewhat higher than those found in LSF extracts, where only slight significant differences ( $P \leq 0.05$ ) of up to 48 h in NF samples were observed (Fig. 2A). These results are higher than those for fermented lentil extracts shown by Torino et al. (2013). These differences indicate that the antioxidant compounds undergo different modifications during legume fermentation that depend not only on the microorganisms involved but also on legume composition.

During fermentation, the bacterial proteolytic activity leads to the release of peptides and to the hydrolysis of phenolic compounds to more simple forms (Lee et al., 2013). Both peptides and soluble phenolic compounds may contribute to the peroxyl-scavenging activity measured by the ORAC-FL method. The low protein hydrolysis observed during SSF in this work suggests that the increase of antioxidant activity in solid fermented kidney beans cannot be attributed to the formation of bioactive peptides during fermentation. This hypothesis is supported by the negative correlation found between ORAC and peptide content ( $r = -0.77$ ). In contrast, high correlation between ORAC and SPC content was obtained in fermented bean ingredients ( $r = 0.94$ ), suggesting a large contribution of phenolic compounds to the antioxidant activity of these extracts. In this sense, our results are in accordance with those reported by Dueñas et al. (2007), who found a high correlation between specific phenolic compounds (e.g. *p*-hydroxybenzoic acid and *trans-p*-coumaroylmalic acid) and the antioxidant activity of fermented lentils.

### 3.7. Angiotensin converting enzyme inhibitory (ACEI) activity of bean extracts

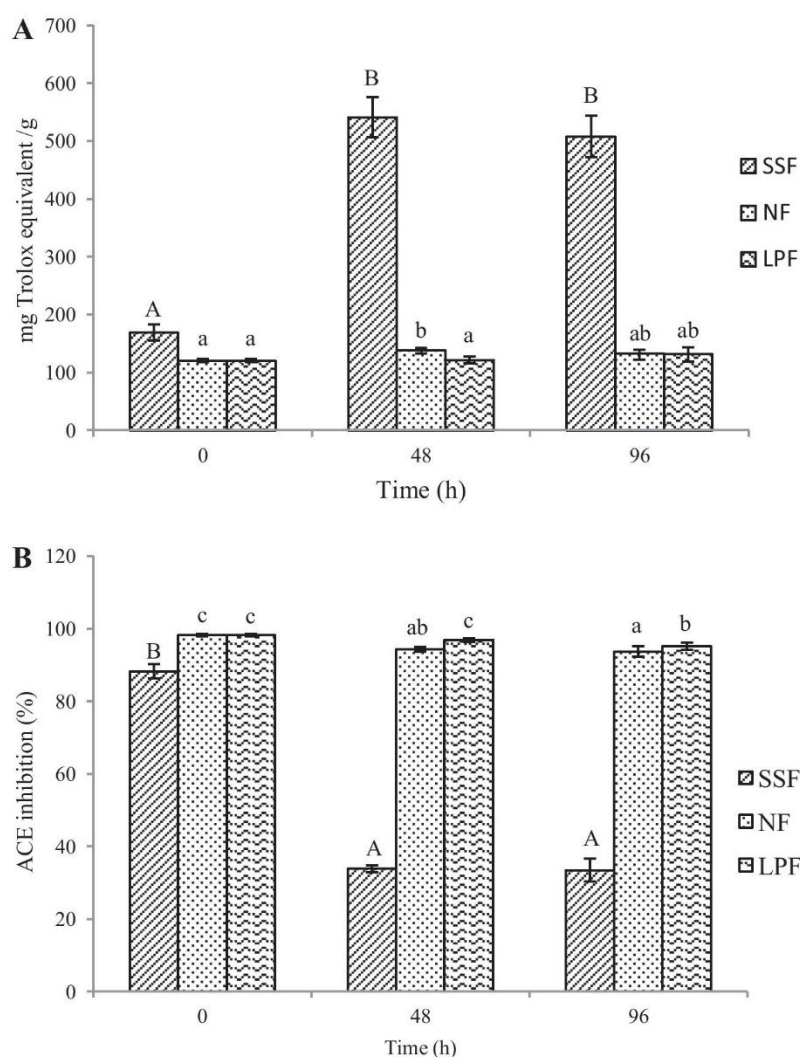
The inhibition of ACE activity by dietary compounds can lead to the reduction of blood pressure and, hence, their consumption may play an important role in promoting cardiovascular health. ACEI

activity exerted by the water-soluble extracts obtained in this work is illustrated in Fig. 2B. Non-fermented extracts showed a high ACEI activity (>88%), indicating their high antihypertensive potential that can be attributed to their high concentration of phenolic compounds, as shown previously. These results are consistent with those reported by Juan, Wu, and Chou (2010) for black soybean water-soluble extracts.

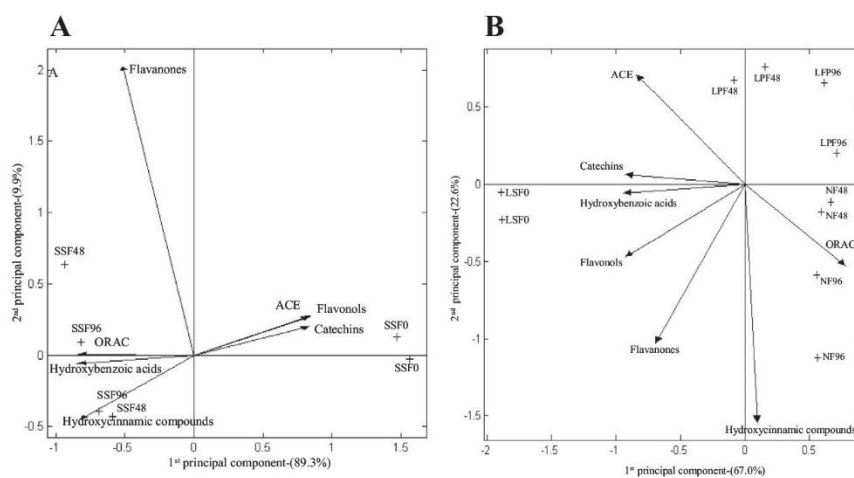
Fermentation with *B. subtilis* for 48 h led to a sharp decrease in ACEI activity (~34%), which was maintained up to the end of the SSF process (Fig. 2B). These findings indicate that SSF kidney bean extracts could not be considered as antihypertensive ingredients. These results differ substantially from those reported for natto soluble extracts, in which the ACEI activity increased after 18 h fermentation with different *B. subtilis* strains (Juan et al., 2010). The differences found between both studies can be explained by the legume material, the fermentation conditions, as well as the starter strains used during fermentation that probably contribute in a different manner to the formation of ACE inhibitory compounds.

In contrast, the ACEI activity of LSF bean extracts was similar or slightly lower to that observed in unfermented kidney bean extracts (~90%) (Fig. 2B), results that can be attributed to the similar content of SPC (Table 1). The extracts obtained after fermentation for 48 h (NF48 and LPF48) were selected to calculate  $IC_{50}$  values, since they showed values slightly higher than those obtained at 96 h. Both extracts exhibited quite similar  $IC_{50}$  values (41.63 and 39.17  $\mu$ g protein/ml for NF48 and LPF48, respectively). To our knowledge, this is the first study reporting ACEI activity in water-soluble extracts obtained from liquid-state fermented kidney beans. These water-soluble extracts exhibited similar ACEI activity than fermented soybean milk (34.26–39.5  $\mu$ g protein/ml) (Martínez-Villaluenga et al., 2012) and significantly higher ACEI activity than LSF lentil extracts (200  $\mu$ g protein/ml) (Torino et al., 2013) and lentil protein hydrolysates (440  $\mu$ g protein/ml) (Boye, Roufik, Pesta, & Barbana, 2010).

In order to establish the contribution of the phenolic compounds identified in fermented bean extracts in their antioxidant and ACE inhibitory activities, principal components analysis (PCA) was carried out (Fig. 3). Seven components were obtained in both SSF and LSF processes. The first two components accounted for 89.2% and 99.2% of the total variance for LSF and SSF, respectively. In both fermentation processes, non-flavonoid compounds (hydroxybenzoic acids and hydroxycinnamic compounds) were



**Fig. 2.** (A) Antioxidant activity of water-soluble extracts obtained from kidney beans by solid and liquid state fermentations. (B) ACE inhibitory activity (%) of water-soluble extracts obtained from kidney beans by solid and liquid state fermentations. Each value corresponds to the mean of three independent replicates. Different upper-case letters indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ) among solid-state fermentation samples (SSF). Different lower-case letters indicate significant differences ( $P \leq 0.05$ ) among liquid-state fermentation samples (NF, natural fermentation or LPF, fermentation with *L. plantarum*).



**Fig. 3.** Plot of principal components of the ORAC, ACEI and phenolic compounds in water-soluble extracts obtained from kidney beans by (A) solid-state fermentation (SSF); (B) liquid-state fermentation (NF, natural fermentation or LPF, fermentation with *L. plantarum*).



positively correlated to antioxidant activity. Previous studies have shown that free and combined hydroxycinnamic compounds exhibit greater antioxidant activity than hydroxybenzoic acids (Alamed, Chaayasit, McClements, & Decker, 2009). Furthermore, it has been reported that the esterification of *p*-coumaric and ferulic acids leads to the *in vitro* inhibition of low-density lipoprotein oxidation and the esterified compounds show higher protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems (Kanski, Aksenova, Stoyanova, & Butterfield, 2002). Thus, the dimerisation of ferulic acid increased the antioxidant capacity with respect to the free form of hydroxycinnamic acid (Adelakun, Kudanga, Parker, Green, & Roes-Hill, 2012).

Flavonoid compounds, catechins and flavonols appeared to be more highly and positively correlated to ACEI activity. Catechins showed the greatest influence on ACEI activity in the case of LSF (Fig. 3A), whilst for SSF the identified flavonols were more highly correlated with ACEI activity (Fig. 3B). Guerrero et al. (2012) suggested that flavonoids, due to their structure, are an excellent source of functional antihypertensive products.

#### 4. Conclusions

The results presented in this work reveal that kidney bean var. Pinto is a good source of bioactive compounds and solid and liquid state fermentations are valuable processes to obtain water-soluble functional extracts. SSF extracts presented higher contents of soluble phenolic compounds and antioxidant activity whilst LSF extracts showed potential antihypertensive activity due to their high GABA content and ACEI activity. These findings are of a key relevance not only for the development of water-soluble bean extracts with health-promoting benefits against CVD that can be incorporated as functional ingredients in novel foods and nutraceuticals, but also to encourage the consumption of fermented legumes as a source of bioactive compounds.

#### Acknowledgements

This work was supported by AGL2010-16310 projects from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain). R. I. L. is indebted to a JAE-pre grand funded by CSIC (Spain) and European Social Fund (FSE-EU). M.I.T. is indebted to CONICET (Argentina) for the Foreign Postdoctoral Fellowship under the Scholarship Program for Young Researchers 2010. M.D thanks the Spanish “Ramón y Cajal” Programme funded by Ministerio de Economía y Competitividad (Spain).

#### References

Adegate, E., & Ponery, A. S. (2002). GABA in the endocrine pancreas: Cellular localization and function in normal and diabetic rats. *Tissue Cell*, 34, 1–6.

Adelakun, O. E., Kudanga, T., Parker, A., Green, I. R., & Roes-Hill (2012). Laccase-catalyzed dimerization of ferulic acid amplifies antioxidant activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74, 29–35.

Akihiro, T., Koike, S., Tani, R., Tominaga, T., Watanabe, S., Iijima, Y., et al. (2008). Biochemical mechanism on GABA accumulation during fruit development in tomato. *Plant & Cell Physiology*, 49, 1378–1389.

Alamed, J., Chaayasit, W., McClements, J., & Decker, E. A. (2009). Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2969–2976.

Allagheny, N., Obanu, Z. A., Campbell-Platt, G., & Owens, J. D. (1996). Control of ammonia formation during *Bacillus subtilis* fermentation of legumes. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 321–333.

Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. F. R., & Santos-Buelga, C. (2012). Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1576–1582.

Boye, J. I., Roufik, S., Pesta, N., & Barbana, C. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties and SDS–PAGE of red lentil protein hydrolysates. *LWT – Food Science and Technology*, 43, 987–991.

Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) – Model food legumes. *Plant and Soil*, 252, 55–128.

Crujeiras, A. B., Parra, D., Abete, I., & Martínez, J. A. (2007). A hypocaloric diet enriched in legumes specifically mitigates lipid peroxidation in obese subjects. *Free Radical Research*, 41, 498–506.

Dajanta, K., Apichartsrangkoon, A., & Chuksitiro, E. (2011). Antioxidant properties and total phenolics of Thua Nao (a Thai fermented soybean) as affected by *Bacillus*-fermentation. *Microbial & Biochemical Technology*, 3, 056–059.

Del Rio, D., Rodríguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary polyphenols in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18, 1818–1892.

Di Cagno, R., Mazzacane, F., Rizzello, C. G., Angelis, M. D. E., Giuliani, G., Meloni, M., et al. (2010). Synthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: Functional grape must beverage and dermatological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 731–741.

Dueñas, M., Fernández, D., Hernández, T., Estrella, I., & Muñoz, R. (2005). Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L.). Modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 297–304.

Dueñas, M., Hernández, T., & Estrella, I. (2007). Changes in the content of bioactive polyphenolic compounds of lentils by the action of exogenous enzymes. Effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 101, 90–97.

Dueñas, M., Hernández, T., Robledo, S., Lamparri, G., Estrella, I., & Muñoz, R. (2012). Bioactive phenolic compounds of soybean (*Glycine max* cv. Merit): Modifications by different microbiological fermentations. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, 62, 241–250.

FAO Statistical Yearbook (2013). *World food and agriculture*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Frias, J., Song, Y. S., Martínez-Villaluenga, C., González de Mejía, E., & Vidal-Valverde, C. (2008). Immunoreactivity and amino acid content of fermented soybean products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 99–105.

García-Marino, M., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2010). Colour and pigment composition of red wines obtained from co-maceration of Tempranillo and Graciano varieties. *Analytica Chimica Acta*, 660, 134–142.

Georgetti, S. R., Vicentini, F. T. M. C., Yokoyama, C. Y., Borin, M. F., Spadaro, A. C. C., & Fonseca, M. J. V. (2009). Enhanced *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and mobilization of free phenolic compounds of soybean flour fermented with different  $\beta$ -glucosidase-producing fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 459–466.

Guerrero, L., Castillo, J., Quinones, M., García-Vallve, S., Arola, L., Pujadas, G., et al. (2012). Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: Structure–activity relationship studies. *PLoS One*, 7, e49493.

Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., et al. (2003). Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, 490–495.

Juan, M. Y., & Chou, C. C. (2010). Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715. *Food Microbiology*, 27, 586–591.

Juan, M. Y., Wu, C. H., & Chou, C. C. (2010). Fermentation with *Bacillus* spp. as a bioprocess to enhance anthocyanin content, the angiotensin converting enzyme inhibitory effect, and the reducing activity of black soybeans. *Food Microbiology*, 27, 918–923.

Kanski, J., Aksenova, M., Stoyanova, A., & Butterfield, D. A. (2002). Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems *in vitro*: Structure–activity studies. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 273–281.

Ko, C. Y., Lin, H.-T. V., & Tsai, G. J. (2013). Gamma-aminobutyric acid production in black soybean milk by *Lactobacillus brevis* FPA 3709 and the antidepressant effect of the fermented product on a forced swimming rat model. *Process Biochemistry*, 48, 559–568.

Lambert, R. L., & Stratford, M. (1999). Weak-acid preservatives: Modelling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 157–164.

Lee, B. H., Lo, Y. H., & Pan, T. M. (2013). Anti-obesity activity of *Lactobacillus* fermented soy milk products. *Journal of Functional Foods*, 5, 905–913.

Limón, R. I., Peñas, E., Martínez-Villaluenga, C., & Frias, J. (2014). Role of elicitation on the health-promoting properties of kidney bean sprouts. *LWT – Food Science and Technology*, 56, 328–334.

Liao, W. C., Wang, C. Y., Shyu, Y. T., Yu, R. C., & Ho, K. C. (2013). Influence of preprocessing methods and fermentation of adzuki beans on  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) accumulation by lactic acid bacteria. *Journal of Functional Foods*, 5, 1108–1115.

López, A., El Naggar, T., Dueñas, M., Ortega, T., Estrella, I., Hernández, T., et al. (2013). Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 138, 547–555.

Luthria, D. L., & Pastor-Corrales, M. A. (2006). Phenolics acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 205–211.

Martínez-Villaluenga, C., Torino, M. I., Martín, V., Arroyo, R., García-Mora, P., Pedrola, I. E., et al. (2012). Multifunctional properties of soy milk fermented by *Enterococcus faecium* strains isolated from raw soy milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10235–10244.



- McDonald, L. C., Fleming, H. P., & Hassan, H. M. (1990). Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 2120–2124.
- Murakami, K., Yamanaka, N., Ohnishi, K., Fukayama, M., & Yoshino, M. (2012). Inhibition of angiotensin I converting enzyme by subtilisin NAT (nattokinase) in natto, a Japanese traditional fermented food. *Food & Function*, 3, 674–678.
- Omura, K., Hitosugi, M., Zhu, X., Ikeda, M., & Maeda, H. (2005). A newly derived protein from *Bacillus subtilis* natto with both antithrombotic and fibrinolytic effects. *Journal of Pharmacological Sciences*, 99, 247–251.
- Park, K.-B., & Oh, S.-H. (2006). Enhancement of  $\gamma$ -aminobutyric acid production in Chungkukjang by applying a *Bacillus subtilis* strain expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis*. *Biotechnology Letters*, 28, 1459–1463.
- Reddy & Krishnan (2013). Characterization of enzyme released antioxidant phenolic acids and xylooligosaccharides from different graminaceae or poaceae members. *Food Biotechnology*, 27, 357–370.
- Rodríguez, H., Landete, J. M., de las Rivas, B., & Muñoz, R. (2008). Metabolism of food phenolic acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748<sup>T</sup>. *Food Chemistry*, 107, 1393–1398.
- Rui, X., Boye, J. I., Ribereau, S., Simpson, B. K., & Prasher, S. O. (2011). Comparative study of the composition and thermal properties of protein isolates prepared from nine *Phaseolus vulgaris* legume varieties. *Food Research International*, 44, 2497–2504.
- Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394–406.
- Schindler, S., Zelena, K., Krings, U., Bez, J., Eisner, P., & Berger, R. G. (2012). Improvement of the aroma of pea (*Pisum sativum*) protein extracts by lactic acid fermentation. *Food Biotechnology*, 26, 58–74.
- Sestelo, A. B. F., Poza, M., & Villa, T. G. (2004).  $\beta$ -Glucosidase activity in a *Lactobacillus plantarum* wine strain. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20, 633–637.
- Song, Y. S., Frias, J., Martínez-Villaluenga, C., Vidal-Valverde, C., & Gonzalez de Mejía, E. (2008). Immunoreactivity reduction of soybean meal by fermentation, effect on amino acid composition and antigenicity of commercial soy products. *Food Chemistry*, 108, 571–581.
- Starzyńska-Janiszewska, A., Stodolak, B., & Mickowska, B. (2013). Effect of controlled lactic acid fermentation on selected bioactive and nutritional parameters of tempeh obtained from unhulled common bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 359–366.
- Torino, M. I., Limón, R. I., Martínez-Villaluenga, C., Mäkinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde, C., et al. (2013). Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chemistry*, 136, 1030–1037.
- Vicente-Villardón, J. L. (2010). *Multibplot: A package for multivariate analysis using biplots*. Departamento de Estadística, Universidad de Salamanca [<http://biplot.usa.es/ClassicalBiplot/index.html>].
- Weng, T. M., & Chen, M. T. (2010). Changes of protein in natto (a fermented soybean food) affected by fermenting time. *Food Science Technology Research*, 16, 537–542.
- World Health Organization, (2013). Noncommunicable diseases. Fact sheet 355.

---

## DISCUSIÓN GENERAL

---



## **5. Discusión general**

Durante la última década, las demandas de los consumidores en el campo de la alimentación han cambiado considerablemente, ya que cada vez son más los que consideran que los alimentos influyen directamente en la salud. Así, ha cambiado la percepción que los consumidores tienen de los alimentos, que han pasado de representar solamente un modo de satisfacer el hambre y proporcionar los nutrientes necesarios, a ser considerados también como una herramienta para prevenir enfermedades relacionadas con la nutrición y mejorar el bienestar físico y mental (Menrad, 2003). Este cambio en las expectativas de los consumidores ha llevado a la industria alimentaria a prestar más atención al desarrollo de nuevos productos mediante tecnologías innovadoras que satisfagan las demandas de los consumidores de disponer de alimentos saludables con propiedades beneficiosas para la salud. En este contexto, los alimentos funcionales constituyen una de las áreas más interesantes de innovación para la industria alimentaria. De hecho, el mercado de los alimentos funcionales ha experimentado un rápido crecimiento en la última década, fenómeno relacionado con el incremento continuo de los costes sanitarios, con el aumento progresivo de la esperanza de vida, con la mayor concienciación de los consumidores sobre la importancia de la nutrición en la salud y con el deseo de los consumidores de envejecer con una alta calidad de vida (Kotilainen y col., 2006). Por tanto, la producción de alimentos dirigidos al control de la hipertensión es de indudable interés socioeconómico.

Las leguminosas constituyen alimentos ideales para la obtención de ingredientes funcionales que puedan emplearse en la elaboración de alimentos dirigidos a la prevención de la hipertensión ya que contienen numerosos compuestos bioactivos a los que se les atribuye su efecto beneficioso en la reducción de la presión sanguínea. El procesado de las leguminosas puede dar lugar a la transformación de compuestos como los polifenoles en formas biológicamente más activas, así como a la formación de nuevos compuestos bioactivos como el GABA o péptidos bioactivos, que podrían incrementar las propiedades antihipertensivas de los productos obtenidos. De este modo, la aplicación de tratamientos tecnológicos en las leguminosas puede considerarse como una estrategia eficaz no sólo para prolongar la vida útil y mejorar el valor nutritivo de estos alimentos

sino que, además, puede potenciar sus propiedades bioactivas y permitir el desarrollo de nuevos alimentos e ingredientes funcionales eficaces en la prevención o control de enfermedades crónicas como la hipertensión. Este hecho es de gran interés no solo para los consumidores sino también para la industria alimentaria al diversificarse la gama de productos funcionales en el mercado, con los consecuentes beneficios socioeconómicos que su consumo supondría.

En este contexto se enmarca el trabajo de investigación desarrollado en la presente Memoria, cuya finalidad ha sido doble. Por un lado, se ha abordado la germinación en presencia de diversos elicitores como una estrategia tecnológica para incrementar el contenido y modificar la composición de compuestos fenólicos así como los niveles de GABA y las actividades antioxidante e inhibidora de la ECA en germinados de judías pintas (Publicaciones I y II). Por otro lado, se ha estudiado la viabilidad de la fermentación en estados sólido y líquido para obtener ingredientes derivados de lentejas castellanas (Publicación III) y judía pintas (Publicación IV) enriquecidos en compuestos bioactivos y con potenciales propiedades antihipertensivas que puedan emplearse, posteriormente, en la elaboración de alimentos funcionales.

### **5.1 Efectividad del tratamiento con elicitores para mejorar la composición de fitoquímicos y la potencial actividad antihipertensiva de germinados de judía (*P. vulgaris* var. pinto).**

Las plantas producen una gran variedad de metabolitos secundarios, también llamados fitoquímicos (Dixon, 2001), de gran interés funcional ya que su consumo se ha asociado con un efecto promotor de la salud. La mayoría de los metabolitos secundarios en los vegetales tienen un papel crucial en los sistemas de defensa constitutivos o inducibles frente a patógenos o estreses ambientales. El uso de elicitores, empleado en los últimos años para inducir resistencia a estrés y patógenos en diferentes cultivos (Aranega-Bou y col., 2014) ha resurgido como una herramienta útil para mejorar el contenido y composición de fitoquímicos y, con ello, aumentar el valor añadido y calidad de los alimentos vegetales (Poulev y col., 2003; Smetanska, 2008; Baenas y col., 2014). Esta estrategia se ha utilizado en el presente estudio para optimizar el contenido de

GABA y compuestos fenólicos y, en consecuencia, el potencial antihipertensivo de germinados de judía (Publicación I). Para ello, se eligió un grupo de elicitores como el ácido ascórbico, el ácido fólico y los quitosanos por su efecto fortalecedor del vigor y el rendimiento de los germinados e inductor de la síntesis de compuestos fenólicos (Burguieres y col., 2007; Randhir y Shetty, 2007; El Hadrami y col., 2010) y el ácido glutámico (Bai y col., 2009; Guo y col., 2012) y ácido glutámico con quitosanos como inductores de la síntesis de GABA (Oh, 2003) en distintos vegetales. Las semillas de judía se irrigaron mediante capilaridad durante 8 días a una concentración dada, que fue seleccionada en base a los resultados de estudios previos en otras semillas (Oh, 2003; Burguieres y col., 2007 y 2008; Randhir y Shetty, 2007). Teniendo en cuenta que el efecto de los elicitores sobre la acumulación de fitoquímicos en los germinados varía con el tiempo de germinación, se analizaron diferentes parámetros (perfil proteico, contenido en GABA, polifenoles totales y actividades antioxidante e inhibidora de la ECA) a los 4, 6 y 8 días de germinación y se compararon con germinados control obtenidos con agua a los mismos días de germinación.

Los elicitores elegidos para realizar el estudio fueron compuestos naturales que tienden a ser mejor tolerados por los vegetales que los compuestos sintéticos (Aranega-Bou y col., 2014); sin embargo, fue necesario comprobar su inocuidad ya que se ha descrito que elevadas concentraciones de algunos elicitores como el ácido ascórbico pueden llegar a suprimir la germinación de semillas de trigo (Ishibashi y Iwaya-Inoue, 2006) y arroz (Ye y Zhang, 2012). Por tanto, en primer lugar se determinó si el tratamiento de las semillas de judía pinta con los elicitores afectaba negativamente a la germinación. Los resultados indicaron, de forma general, que la aplicación de los distintos tratamientos no afectaba negativamente al porcentaje de germinación, siendo éste superior al 90% en todos los casos a excepción del tratamiento combinado de ácido glutámico y quitosanos durante 6 días que redujeron ligeramente los porcentajes medios de germinación a un 80-84%.

Se ha descrito que la germinación restaura las actividades metabólicas de la semilla dando lugar a cambios fisiológicos y bioquímicos entre los que se incluye la sobreexpresión de enzimas implicadas en la degradación de proteínas (Urbano y col., 2005; Dogra y col., 2013). En consistencia con estos hallazgos, nuestros resultados



indicaron que la germinación conduce a la degradación de globulinas tipo vicilina y de lectina, haciéndose este efecto más notable a los 8 días de germinación. Esta degradación de proteínas fue relacionada con la acumulación de fragmentos de proteína de bajo peso molecular alcanzando el máximo a los 8 días de germinación. Savelkoul y col. (1994) también observaron la degradación de lectina y faseolina en judías después de 10 días de germinación. Por otro lado, estudios anteriores han demostrado que el uso de elicitores durante la germinación de semillas provoca una reorganización en la expresión de proteínas que afecta al metaboloma del embrión y de los tejidos que lo rodean (Fercha y col., 2014). En nuestro estudio, sin embargo, no se observaron claras diferencias en el perfil proteico de los germinados de judía pinta tratados con elicitores comparado con el control. Esto podría ser debido al bajo poder de resolución de la electroforesis en gel unidimensional. Otros autores han observado mediante técnicas más robustas como la NanoHPLC-MS que el tratamiento de semillas de trigo con ácido ascórbico 0,5 mM (concentración igual a la utilizada en el presente estudio) durante la fase de imbibición provoca una variación significativa en la abundancia de proteínas metabólicas en el embrión de semillas de trigo (Fercha y col., 2014).

Los resultados del contenido en GABA pusieron de manifiesto que los tratamientos con ácido ascórbico, ácido glutámico y ácido glutámico+quitosanos daban lugar a una mayor acumulación de GABA a los 4, 8 y 4 días de germinación, respectivamente. Durante la germinación, el GABA es sintetizado principalmente por la GD (EC 4.1.1.15) (Bouché y Fromm, 2004), aunque otros autores han descrito que este aminoácido puede sintetizarse también durante la germinación a través de la oxidación de poliaminas por la enzima diaminoxidasa (DAO; EC 1.4.3.6) (Guo y col., 2012). El empleo de soluciones de ácido glutámico durante la germinación aumenta la actividad de la GD y DAO, como se ha demostrado en soja (Guo y col., 2012) y haba (Yang y col., 2013). Estos resultados explican la mayor concentración de GABA observada en los germinados de judía tratados con ácido glutámico y ácido glutámico+quitosano. Por otra parte, el ácido ascórbico induce la expresión de proteínas implicadas en el metabolismo de aminoácidos como la glutamato sintetasa dependiente de ferredoxina (GS-Fd; EC 1.4.7.1) y la asparagina sintetasa (AS; EC 6.3.5.4) (Fercha y col., 2014). La GS-Fd cataliza un paso importante en la ruta de biosíntesis del glutamato (Chang y col., 2010). La AS cataliza la transferencia dependiente de adenosina trifosfato (ATP) del grupo amino de la glutamina a la molécula

de aspartato para generar glutamato y asparagina (Lea y col., 2007). Por tanto, la inducción de ambas enzimas por el ácido ascórbico podría aumentar la síntesis y acumulación de glutamato en los germinados de judía y, en consecuencia, aumentar la acumulación de GABA por la GD como se observó a los 4 días de germinación. En términos de efectividad, el tratamiento con ácido glutámico durante 8 días dio lugar a la mayor acumulación de GABA en los germinados de judía, alcanzándose concentraciones de 95 mg/100 g peso seco. Esta estrategia ha sido utilizada con éxito no sólo para enriquecer en GABA otros productos germinados de soja (Guo y col., 2012), arroz (Oh, 2003), centeno (Limure y col., 2009) y mijo (Bai y col., 2009) sino también, recientemente, para enriquecer el salvado de arroz (Kim y col., 2015). Estudios de intervención en humanos han demostrado que el consumo de 10-20 mg de GABA diarios a través de productos enriquecidos previene la pre-hipertensión en individuos sanos (Inoue y col., 2003; Pouliot-Mathieu y col., 2013). Teniendo en cuenta estos estudios y la concentración de GABA máxima alcanzada en el presente trabajo (Publicación I), el consumo de una ración de 45 g de germinados de judía frescos cubriría el 100% del aporte de GABA necesario para reducir el riesgo de pre-hipertensión.

Para estudiar el efecto de los elicitores en el contenido total de polifenoles en los germinados fue necesario realizar una extracción en medio ligeramente alcalino para la posterior determinación de los compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados indicaron que la germinación de judía pinta con ácido fólico durante 6 días y con ácido glutámico durante 6 y 8 días promovía una mayor acumulación en los compuestos fenólicos totales en comparación con el control. La mayor concentración de compuestos fenólicos totales (6,06 mg GAE/g peso seco) se encontró en los germinados de 8 días tratados con ácido glutámico. Estos resultados sugieren que la aplicación de soluciones de ácido glutámico 5 mM durante la germinación podría estimular la ruta de fenilpropanoides y, en consecuencia, favorecer la síntesis y acumulación de compuestos fenólicos en los germinados de judía. Estos resultados han sido descritos por primera vez en nuestro estudio y, hasta el momento, no se ha encontrado información que relacione el efecto del ácido glutámico en el metabolismo de los compuestos fenólicos. Nuestros resultados mostraron que el ácido fólico aumenta el contenido de compuestos fenólicos totales de acuerdo con lo observado por otros autores en germinados de guisante (Burguieres y col., 2007). Shetty y Walhqvist (2004) sugirieron que el ácido fólico podría

potencialmente servir como estimulador de la biosíntesis de prolina mediante la activación de la ruta de las pentosas fosfato a través de la cual se sintetizan algunos precursores de la síntesis de compuestos fenólicos. Los tratamientos con ácido ascórbico, quitosanos y ácido glutámico+quitosanos no resultaron efectivos para aumentar el contenido total de polifenoles en los germinados de judía, en contraste con la información recogida en la bibliografía donde se describe su efecto activador sobre la síntesis de compuestos fenólicos tanto en germinados como en plantas adultas (Burguieres y col., 2007; Randhir and Shetty, 2007; Jayaraj y col., 2009). La efectividad de los elicitores no sólo depende de la dosis, los intervalos de tratamiento y las condiciones ambientales, sino también de la genética de la planta, siendo este último factor el más importante (Aranega-Bou y col., 2014). Por ejemplo, Pérez-Balibrea y col. (2011) observaron, al igual que en el presente trabajo realizado en la judía, que el tratamiento con quitosanos tampoco resulta efectivo para aumentar los compuestos fenólicos totales de germinados de brócoli.

Con el objetivo de determinar si el tratamiento con elicitores mejoraba las actividades antioxidante e inhibidora de la ECA de los germinados de judía, primero se optimizó la extracción de proteínas, péptidos y polifenoles de las muestras. La extracción acuosa a pH 8 permitió la solubilización y extracción del total de proteínas y péptidos y del 75% de los polifenoles totales de la judía. En estos extractos se evaluó la actividad antioxidante mediante el método ORAC. Los resultados indicaron que ningún tratamiento mejora de forma significativa la actividad antioxidante de los germinados de judía por mecanismos de transferencia de átomos de hidrógeno. Existen evidencias en la bibliografía que demuestran que los compuestos fenólicos contribuyen a la actividad antioxidante global de semillas y germinados (Burguieres y col., 2007; Xu y Chang, 2007; Aguilera y col., 2015), sin embargo, en nuestro estudio no hubo correlación entre el contenido total de polifenoles en los germinados y la actividad antioxidante de los extractos. Una posible explicación a estos resultados es que los tratamientos de judía con elicitores pueden afectar a la composición fenólica, como se ha demostrado previamente en germinados de brócoli tratados con ácido salicílico y metil jasmonato (Perez-Balibrea y col., 2011). La estructura química de los polifenoles tiene un papel muy importante en la actividad antioxidante. Estudios sobre la relación estructura-actividad antioxidante de polifenoles concluyen que el número y posición de grupos hidroxilo en la estructura básica

de los compuestos fenólicos afecta significativamente a su capacidad de atrapar radicales mediante mecanismos de donación de átomos de hidrógeno (Jing y col., 2012).

Posteriormente, se evaluó la influencia de los elicitores en la actividad inhibidora de la ECA de los extractos. A los 6 días de germinación se observó una mayor actividad inhibidora de la ECA en los extractos de germinados tratados con ácido fólico, glutámico y glutámico+quitosanos en comparación con el control. De forma similar, en todos los germinados de 8 días tratados con elicitores se consiguió una actividad inhibidora de la ECA significativamente superior al control. Este resultado sugiere un efecto positivo de los elicitores sobre la actividad inhibidora de la ECA de los germinados de judía a tiempos prolongados de germinación (6 y 8 días), siendo estos resultados los primeros que describen la eficacia de distintos elicitores en mejorar la potencial actividad antihipertensiva de alimentos vegetales. La actividad inhibidora de la ECA en los germinados podría atribuirse a péptidos bioactivos, como se ha descrito previamente en lenteja (Bamdad y col., 2009). Durante la germinación se favorece la actividad y expresión de enzimas del metabolismo, como las cisteína proteasas, consideradas como las principales responsables de la degradación de proteínas de almacenamiento (Zakharov y col., 2004). También se ha descrito que algunos polifenoles son potentes inhibidores de la ECA (Guerrero y col., 2012) y, por tanto, podrían contribuir junto con péptidos inhibidores de esta enzima a la actividad inhibidora de la ECA global de los germinados de judía.

Ya que la calidad funcional de un alimento o ingrediente está condicionada por la bioaccesibilidad de sus constituyentes bioactivos, se evaluó el efecto de la digestión gastrointestinal en la actividad inhibidora de la ECA en los extractos de germinados de judía. Para realizar este estudio se eligieron los germinados tratados con ácido glutámico durante 8 días por su mayor contenido en GABA y polifenoles totales. Los resultados mostraron que la actividad inhibidora de la ECA de los extractos era 89 veces superior a la del control después de la digestión. Estos resultados podrían deberse a la liberación de nuevos péptidos inhibidores de la ECA a partir de las proteínas del germinado, lo cual fue confirmado analizando el perfil proteico mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Por tanto, los resultados pusieron de manifiesto que la digestión aumenta la potencia inhibidora de la ECA de los germinados de judía pinta mediante la liberación de nuevos péptidos bioactivos.

En una segunda etapa de este estudio se evaluó el efecto del tratamiento con ácido ascórbico, fólico y glutámico durante 8 días sobre la composición de polifenoles en los germinados de judía pinta (Publicación II). Mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas se identificaron un total de 42 compuestos fenólicos en las semillas y los germinados de judía pinta. El mayor contenido de compuestos fenólicos en las semillas fueron derivados del ácido sinápico unido a ácido aldárico, a diferencia de otras variedades de judía en las que los compuestos fenólicos más abundantes fueron derivados del ácido ferúlico (Lin y col., 2008; López y col., 2013). Dentro del grupo de los flavonoides, las catequinas detectadas como aglicona y O-glucósidos fueron los compuestos más abundantes en las semillas de judía. Las flavanonas (glucósidos de eriodictiol, hesperitina y naringenina), flavonoles (glucósidos de kanferol y quercetina) y antocianinas (glucósidos de pelargonidina, cianidina, y malvidina) también fueron identificados, aunque como compuestos minoritarios. Todos los flavonoides identificados en la judía pinta fueron descritos previamente en otras variedades de judía (Tolosa, Tolosana, mexicana roja, Generic y Jaguar) (Macz-Pop y col., 2006; Lin y col., 2008; López y col., 2013). En la mayoría de las variedades estudiadas hasta el momento, se ha descrito la presencia de proantocianidinas (López y col., 2013; Aguilera y col., 2015), compuestos que no fueron detectados en la judía pinta objeto de esta Memoria. La suma total del contenido de polifenoles libres en las semillas de judía pinta se encontró dentro del rango recogido en la bibliografía para diferentes variedades de judía (19,1-48,3 mg/100g) (Lopez-Amoros, y col., 2006; Luthira y Pastor Corrales, 2006; Lin y col., 2008).

La germinación modificó cualitativa y cuantitativamente la composición fenólica de la judía pinta. De forma general, la germinación en agua disminuyó el contenido total de flavan-3-oles y antocianinas, que fue compensado con un aumento del total de flavanonas y flavonoles. La aparición de algunos compuestos fenólicos en los germinados (eriodictiol-O-hexosido 2, quercetina glucurónido, kanferol glucurónido y kanferol acilhexósido) sugiere su síntesis *de novo* como consecuencia de la posible activación de enzimas de la ruta de fenilpropanoides. El descenso en la concentración de algunos compuestos puede ser atribuido a su solubilización y posterior eliminación en el agua de remojo (Khandelwal y col., 2010), o a la activación del metabolismo de polifenoles que incluye 4 rutas metabólicas: glicolítica, pentosas fosfato, ácido shikímico y fenilpropanoides. En cuanto al



contenido total de polifenoles libres, no se observaron diferencias significativas entre las semillas y las judías germinadas en agua, en contraste con algunos estudios que concluyen que la germinación aumenta la concentración total de polifenoles libres (Dueñas y col., 2009; Shohag y col., 2012; Tajodding y col., 2014). La activación de rutas específicas del metabolismo de compuestos fenólicos depende del tipo de leguminosa y de las condiciones de germinación (iluminación, temperatura y tiempo), lo que permite explicar las diferencias encontradas sobre el efecto de la germinación en el contenido y composición fenólica de diferentes leguminosas (Lopez-Amoros y col., 2006; Swieca y col., 2012).

Como se ha mencionado anteriormente, la biosíntesis de compuestos fenólicos puede inducirse mediante el tratamiento de las semillas con elicitores durante la germinación. Nuestros resultados indicaron que el tratamiento de judías pintas con ácido ascórbico, fólico y glutámico durante 8 días de germinación promueve la síntesis y una mayor acumulación de algunos compuestos minoritarios como glucósidos de flavanonas (eriodictiol-O-hexósido 2 y eriodictiol-O-acilhexósido) y flavonoles (quercetina-3-O-glucósido, kanferol-O-acilhexósido, isoramnetina-O-acilhexósido), encontrándose diferencias en la concentración de estos compuestos dependiendo del elicitador empleado. Por el contrario, el total de compuestos fenólicos disminuyó significativamente en los germinados tratados con los elicitores, en contraposición al aumento de polifenoles totales observado en el primer estudio (Publicación I). Estos resultados sugieren que existe un consumo de compuestos fenólicos para la biosíntesis y reorganización de la pared celular durante la germinación en respuesta al tratamiento con elicitores. En consonancia con esta hipótesis, Randhir y Shetty (2007) concluyeron que la irrigación de semillas de haba con ácido ascórbico durante la germinación aumenta la actividad de enzimas implicadas en procesos de modificación de la pared celular como la guaiacol peroxidasa y, en consecuencia, la proporción de ácidos fenólicos libres destinados al proceso de lignificación. A diferencia de nuestros resultados, otros autores observaron que el tratamiento con elicitores aumenta el contenido total de compuestos fenólicos libres (Shetty y col., 2003; Randhir y col., 2004; Burguieres y col., 2007; Swieca y col., 2014). Estas diferencias podrían ser debidas al tipo de leguminosa, la naturaleza del elicitador, la dosis y el momento y duración del tratamiento (Baenas y col., 2014). Diferentes elicitores pueden estimular diferentes clases de compuestos fenólicos y afectar de

diferente manera a su concentración, siendo estos efectos más dependientes de la genética de la planta que de la naturaleza química del elicitor. Por ejemplo, el ácido ascórbico 500  $\mu\text{M}$  y ácido fólico 50  $\mu\text{M}$  son capaces de aumentar el contenido total de polifenoles libres en germinados de guisante (Burguières y col., 2007) y haba (Rhandir y Shetty, 2007) a través de la activación de la ruta de las pentosas fosfato. Más recientemente, Swieca y col. (2014b) pusieron de manifiesto que la suplementación de lenteja con precursores de la ruta de fenilpropanoides (fenilalanina o tirosina 0,1 mM) aumentaba ligeramente el contenido total de fenoles y flavonoides en germinados de 4 días. Estos efectos se relacionaron con la inducción de enzimas de la ruta de fenilpropanoides como la tirosina amonio liasa y la fenilalanina amonio liasa. Las diferencias observadas entre nuestro estudio y la bibliografía podrían también deberse a la metodología utilizada para la determinación del contenido total de polifenoles libres. La mayoría de los estudios realizados hasta el momento utiliza el método de Folin-Ciocalteu para la cuantificación del total de polifenoles libres en semillas y germinados tratados con elicitores. Este método es menos fiable ya que interfiere con compuestos nitrogenados y azúcares reductores y, por tanto, no se correlaciona siempre con la suma de la concentración de los compuestos individuales determinados por métodos cromatográficos (Siger y col., 2012).

Otro de los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral fue evaluar cómo afectaba la aplicación de elicitores a las actividades antioxidante e inhibidora de la ECA de la fracción fenólica de los germinados de judía pinta (Publicación II). En cuanto a la capacidad antioxidante, no se observaron cambios importantes, a excepción del tratamiento con ácido glutámico que produjo una ligera reducción de la actividad antioxidante de la fracción de compuestos fenólicos libres. En contraposición, estudios anteriores muestran que la utilización de elicitores como la fenilalanina y la tirosina aumentan la actividad antioxidante de germinados de lenteja, hecho relacionado con el aumento en la concentración total de polifenoles libres (Swieca y col. 2014a). En el presente estudio no se obtuvieron correlaciones estadísticamente significativas entre las variables concentración total de polifenoles libres y actividad antioxidante. Sin embargo, cabe destacar que el análisis de componentes principales relacionó positivamente la actividad antioxidante con el contenido total de catequinas, ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos. Diferentes estudios han revelado el importante papel que juega la

estructura química de los polifenoles en su actividad atrapadora de radicales. Estudios previos han demostrado que los flavonoides presentan una capacidad antioxidante superior a los compuestos no flavonoides. Las propiedades antioxidantes de los ácidos hidroxycinámicos han sido recientemente caracterizadas observándose que el ácido *p*-cumárico exhibe la mayor capacidad de atrapar ERO, seguido del ácido ferúlico y los ácidos hidroxibenzoicos (Koroleva et al., 2014), los cuales están presentes en las semillas y germinados. Además de los compuestos fenólicos, otros antioxidantes adicionales como la melatonina y vitaminas podrían estar contribuyendo a la actividad antioxidante global de los germinados (Fernández-Orozco y col., 2008; Aguilera y col. 2015).

Los extractos fenólicos de los germinados tratados con elicitores mostraron una actividad inhibidora de la ECA significativamente más alta que el control, observándose una mayor inhibición de la ECA en los extractos de germinados tratados con ácido fólico. Estos resultados vuelven a confirmar el efecto positivo del uso de elicitores para mejorar la potencial actividad antihipertensiva de los germinados de judía. Estudios anteriores han demostrado que ciertos flavonoides pueden actuar como inhibidores de la ECA y, por tanto, modular la presión arterial a través del SRAA (Aviram y Dornfeld, 2001; Guerrero y col., 2012). La quercetina y el kanferol son los inhibidores de la ECA más potentes descritos hasta el momento (Guerrero y col., 2012; Al Shukor y col., 2013). La elevada potencia de inhibición de la ECA mostrada por ciertos flavonoides está directamente relacionada con la combinación de varios elementos clave en la estructura química entre los que se incluye el grupo catecol del anillo B, el doble enlace entre el C2 y C3 del anillo C y el grupo cetona en el C4 del anillo C (Guerrero y col., 2012). Por tanto, la mayor potencia de inhibición encontrada en los extractos fenólicos de germinados tratados con elicitores podría deberse a su mayor contenido en algunos derivados de kanferol y quercetina. Adicionalmente, la concentración de eriodictyol-O-acilhexósido se correlacionó positivamente con la actividad inhibidora de la ECA ( $r = 0,789$ ;  $p=0,02$ ) pudiendo ser este compuesto también responsable de la mayor actividad de los extractos fenólicos de los germinados de judía pinta tratados con elicitores.

En base a los resultados obtenidos, el tratamiento con elicitores como práctica habitual en la producción de germinados podría ser establecido como una herramienta

efectiva para enriquecer en compuestos bioactivos los germinados de judía y mejorar sus posibles propiedades antihipertensivas.

## **5.2 Mejora del contenido de compuestos bioactivos y de las propiedades biológicas de judía y lenteja mediante fermentación. Obtención de ingredientes funcionales dirigidos a la prevención de la hipertensión.**

La fermentación se ha empleado en los alimentos desde tiempos ancestrales, existiendo referencias de esta tecnología en la literatura científica desde hace 30 años, si bien en los últimos diez años el número de artículos referentes a estudios de fermentación de alimentos se ha multiplicado por cinco (Borresen y col., 2012). Este incremento del número de investigaciones en este campo se debe al aumento de la popularidad de los productos fermentados, generalmente aquellos de origen lácteo, que en la actualidad tienen gran importancia en nuestra dieta, habiéndose estimado que constituyen el 25-30% de la dieta en Europa (Borresen y col., 2012; Bartkiene y col., 2014). El empleo de esta tecnología en leguminosas es más reciente que en los alimentos de origen animal, pero ha demostrado ser muy eficaz en la eliminación de los factores no nutritivos, en la mejora de la digestibilidad proteica y en la reducción de la alergenicidad (Frias y col., 2008; Starzynska-Janiszewska y col., 2013). La mayor parte de los estudios sobre fermentación de leguminosas se han realizado en soja, donde se ha demostrado que este proceso da lugar a la formación de compuestos con efectos beneficiosos para la salud (Gibbs y col., 2004; Martínez-Villaluenga y col., 2012; Lee y col., 2013; Wang y col., 2013). Los estudios realizados para mejorar la acumulación de compuestos bioactivos en otras leguminosas son, sin embargo, muy escasos a pesar de que en Europa existen leguminosas autóctonas con un enorme potencial para la producción de ingredientes fermentados funcionales. Por este motivo, este trabajo de investigación se ha realizado en judías y lentejas, dos leguminosas ampliamente consumidas en España con alto contenido proteico y de compuestos fenólicos, que gozan de gran aceptación por parte del consumidor y que, sin embargo, han sido industrialmente

infrautilizadas para la producción de ingredientes/alimentos funcionales o productos nutraceuticos.

Parte del trabajo de esta memoria se ha centrado en estudiar la viabilidad de dos procesos de fermentación diferentes: en estado sólido empleando *B. subtilis* y en estado líquido bien realizado de forma natural por la microbiota presente en las semillas o dirigido con la inoculación de *L. plantarum*. La fermentación en estado sólido presenta varias ventajas sobre la fermentación en estado líquido ya que es un proceso más simple y económicamente más rentable, de mayor productividad y con menor impacto ambiental (Couto y Sanromán, 2006). Sin embargo, esta técnica presenta también algunas desventajas como la dificultad en el control de los parámetros del proceso y en el escalado. Además, la fermentación en estado sólido es adecuada cuando están implicados hongos filamentosos o microorganismos que requieren menos actividad de agua, pero no puede emplearse con bacterias que requieren una actividad de agua elevada como las BAL (Babu y Satyanarayana, 1996). Dado que ambos procesos presentan ventajas e inconvenientes, el objetivo de la segunda parte de esta Memoria ha sido establecer una comparación entre ambos tipos de fermentación, con el fin de determinar el proceso más idóneo para maximizar propiedades antihipertensivas potenciales de lentejas y judías. Es importante señalar que todos los análisis se han realizado en extractos acuosos obtenidos de los productos fermentados derivados de judía y lenteja. La obtención de extractos acuosos puede considerarse un aspecto novedoso e interesante de esta Tesis Doctoral, ya que pueden emplearse como ingredientes en la elaboración de diferentes productos alimenticios con propiedades bioactivas.

Las condiciones del proceso de fermentación (pH, temperatura, tiempo) son cruciales ya que condicionan el crecimiento de los microorganismos fermentativos y afectan a la expresión y actividad de las enzimas implicadas en la síntesis o biotransformación de los compuestos bioactivos presentes en las leguminosas. Por este motivo, en primer lugar, se evaluó el crecimiento de las poblaciones de bacterias fermentativas en las condiciones de fermentación seleccionadas, así como la evolución del pH, estrechamente relacionado con la proliferación microbiana ya que las bacterias producen metabolitos durante su crecimiento que acidifican o basifican el pH. Los



estudios realizados en lentejas castellanas (publicación III) y judías pintas (publicación IV) indicaron que durante la fermentación en estado líquido la población de BAL aumentó significativamente durante las primeras 48 h, y el crecimiento fue superior en la fermentación natural que en la realizada con *L. plantarum*. La viabilidad de la población de BAL se mantuvo constante hasta las 96 h en la fermentación natural, pero disminuyó significativamente en la fermentación con *L. plantarum*. La proliferación de esta población bacteriana durante la fermentación fue acompañada de una disminución del pH, que fue superior en las fermentaciones inducidas de judías y lentejas. Es bien conocido que los ácidos orgánicos liberados durante el metabolismo de las BAL tiene un efecto inhibitorio sobre la mayor parte de los microorganismos, fenómeno que explicaría la disminución drástica hasta niveles no detectables observada en las poblaciones de enterobacterias, hongos y levaduras durante las primeras 48 h de fermentación de lenteja. El efecto inhibitorio de los ácidos orgánicos se debe al aumento en la concentración de protones en el medio, que penetra en las células bacterianas y acidifica el citoplasma, inhibiendo las funciones metabólicas (Lambertt y Strattford, 1999). Ha sido previamente descrito que la proliferación de *L. plantarum* se inhibe a valores de pH intracelulares de 4,6-4,8, que se corresponden con valores de pH extracelulares cercanos a 3 (McDonald y col., 1990). El bombeo de protones desde el citoplasma al medio extracelular es energéticamente muy costoso (Begley y Gaham, 2005), por lo que *L. plantarum* reduce significativamente la eliminación citoplasmática de protones a valores muy bajos de pH para ahorrar energía (Ramos y col., 2014). Este fenómeno podría explicar la disminución de la viabilidad de *L. plantarum* observada tanto en lentejas como en judías a las 96 h de fermentación, cuando se alcanzaron valores de pH de 3,5-3,7. En el curso de la fermentación en estado sólido de judías y lentejas, en cambio, se produjo una alcalinización del medio a medida que la población de *B. subtilis* fue proliferando. Este aumento de pH puede atribuirse a la elevada actividad proteolítica de esta bacteria sobre las proteínas de las leguminosas, que conduce a la liberación de aminoácidos que son, a su vez, metabolizados produciendo amonio (Sarkar, 1993; Allagheni y col., 1996). Los valores de pH alcanzados al final de la fermentación sólida están en el rango de los obtenidos por Chantawannakul y col. (2002) durante la fermentación de soja con *B. subtilis* a 37°C durante 72 h.

Otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue la evaluación del efecto de la fermentación en el contenido de GABA de lentejas y judías. Los resultados obtenidos

pusieron de manifiesto que la concentración de este compuesto se incrementó significativamente durante el proceso de fermentación en estados sólido y líquido, tanto en judías como en lentejas, y este aumento fue dependiente del tiempo. El contenido de GABA, además, fue superior en los ingredientes obtenidos tras la fermentación en estado líquido que en los producidos por fermentación sólida. Liao y col. (2013) también observaron la acumulación de GABA en la judía adzuki fermentada en estado líquido con *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus rhamnosus* durante 6 días. Los niveles de GABA encontrados en los extractos acuosos de lenteja y judía obtenidos a las 48 y 96 h de fermentación líquida fueron similares entre sí al mismo tiempo de fermentación, si bien la fermentación en estado sólido ocasionó un mayor contenido de GABA en los ingredientes derivados de lentejas que en los de judías. Estos resultados indican que la acumulación de GABA en las leguminosas depende no sólo del tipo de leguminosa, sino de los microorganismos implicados en el proceso. *B. subtilis* presenta menor capacidad de sintetizar GABA que otros microorganismos como las BAL (Park y Oh, 2006), fenómeno que explicaría los menores niveles de GABA observados en los ingredientes obtenidos mediante fermentación sólida que en los producidos por fermentación líquida. Además, el proceso de autoclavado al que se sometieron las semillas de lenteja y judía previamente a la fermentación en estado sólido podría haber inactivado la enzima GD endógena de ambas leguminosas, fenómeno que contribuiría a la baja producción de GABA durante este proceso de fermentación. Se ha descrito en la bibliografía que muchas especies de BAL, incluida *L. plantarum*, tienen la capacidad de sintetizar GABA al presentan el gen que codifica para la GD (Di Cagno y col., 2010). La actividad de la enzima GD endógena en judía y lenteja es, probablemente, también responsable del aumento de GABA durante la fermentación en estado líquido, ya que estudios previos han revelado una activación rápida de esta enzima en vegetales en respuesta a la manipulación mecánica, al bajo pH o a condiciones anaerobias (Akihiro y col., 2008). Nuestros resultados revelaron niveles de GABA significativamente superiores en los ingredientes derivados de lentejas y judías obtenidos mediante fermentación natural que en aquellos obtenidos con *L. plantarum* debido, sin duda, al mayor número de especies de BAL con actividad GD implicadas en la fermentación natural. El mayor pH observado durante la fermentación natural posiblemente contribuye también a la mayor acumulación de GABA en estos ingredientes que en los obtenidos por fermentación inducida, ya que se ha descrito que la cepa *L.*

*plantarum* DSM19463 sintetiza mayores niveles de GABA cuando el pH inicial de la mezcla de fermentación (mosto de uva) era 6.0 que cuando era 4.5 (Di Cagno y col., 2010).

Debido a que los compuestos fenólicos son antioxidantes naturales que tienen un efecto protector sobre el desarrollo de la hipertensión (Del Rio y col., 2013), consideramos que era interesante obtener ingredientes fermentados con elevado contenido en polifenoles. Por este motivo, se estudió la concentración de polifenoles solubles en los ingredientes obtenidos mediante ambos procesos de fermentación. Los resultados pusieron de manifiesto que la fermentación en estado líquido, en cualquiera de las dos modalidades ensayadas, no causó cambios o produjo una ligera disminución en el contenido de estos compuestos en los ingredientes derivados de lenteja y judía. Por el contrario, la fermentación en estado sólido resultó en un aumento significativo de los niveles de polifenoles solubles, que puede atribuirse a la producción de esterasas por *B. subtilis*. Estas enzimas hidrolizan enlaces tipos éster entre polifenoles y polisacáridos de la pared celular cuyas actividades óptimas se encuentran a valores de pH 5-7 (Acosta-Estrada y col., 2014), hecho que justificaría los resultados obtenidos. El contenido en compuestos fenólicos en los extractos hidrosolubles de lentejas y judías obtenidos tras la fermentación con *B. subtilis* durante 48 y 96 h fue muy similar (31-36 mg GAE/g extracto), valores que están en el rango observado en extractos metanólicos de Thua Nao, producto derivado de la soja tras su fermentación con *B. subtilis* a 42°C durante 24-72 h (Dajanta y col., 2011, 2013). Además, los ingredientes fermentados de judías y lentejas presentaron niveles superiores de compuestos fenólicos que los descritos previamente en extractos hidrosolubles o metanólicos de soja fermentada con esta bacteria a 30-42°C durante 18-48 h (Fernandez-Orozco y col., 2007; Juan y Chou, 2010). La fermentación natural produjo niveles ligeramente superiores de compuestos fenólicos solubles en los ingredientes de judía y lenteja que la inducida con *L. plantarum*, si bien las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas en judías pintas.

Las diferencias observadas en el contenido de compuestos fenólicos en los ingredientes de judía obtenidos mediante los tres procesos de fermentación estudiados, nos llevó a pensar que sería interesante analizar el efecto del tipo de fermentación en la composición fenólica de estos ingredientes. Los resultados revelaron diferencias

significativas en la composición de compuestos fenólicos de los ingredientes de judía obtenidos antes y después de la fermentación. Previamente a la fermentación sólida, los extractos acuosos iniciales de judía (SSF0) presentaron mayoritariamente ácidos hidroxicinámicos, como los ácidos *p*-cumárico, ferúlico y sinápico unidos a los ácidos aldárico y quínico, representando esta familia el 50% del contenido total de compuestos fenólicos. Estos resultados están de acuerdo con los observados por Luthria y Pastor-Corrales (2006) en judía pinta. Las catequinas (23%), entre las que se identificaron la (+)-catequina y la (+)-catequina hexóxido, constituyeron el segundo grupo mayoritario en los extractos SSF0, seguido por las flavanonas (13%), como los derivados de la hesperetina, naringenina y eriodictol. Los flavonoles (5%), como los glucósicos de quercetina e isoramnetina, representaron el grupo minoritario. Los extractos obtenidos al inicio de la fermentación líquida (LSF0) presentaron diferente composición fenólica: las catequinas (45%) constituyeron el grupo mayoritario, seguido de los derivados hidroxicinámicos (40%) y las flavanonas (9.5%), mientras que los ácidos hidroxibenzoicos (4%) y los flavonoles (1%) fueron los grupos minoritarios. Estos extractos presentaron, además, antocianinas como derivados de la cianidina, la perlargonidina y la malvidina, compuestos que no fueron observados, sin embargo, en los extractos SSF0 debido a la inestabilidad de estos compuestos al tratamiento de autoclavado que tuvo lugar durante la preparación de las muestras. Gran parte de los compuestos identificados en judía pinta han sido previamente observados en judía negra (*P. vulgaris* var. Tolosana) (López y col., 2013).

La fermentación ocasionó cambios tanto cualitativos como cuantitativos en la composición fenólica de los ingredientes de judía pinta. El contenido de ácidos *p*-hidroxibenzoicos aumentó significativamente en los extractos obtenidos tras la fermentación en estado sólido debido, posiblemente, a su síntesis a partir de las hemicelulosas de la judía por la acción de *B. subtilis* (Reddy y Krishnan, 2013). Por el contrario, la concentración de estos compuestos disminuyó tras la fermentación de judías en estado líquido, en mayor medida tras la fermentación natural, hecho que puede atribuirse al metabolismo del ácido *p*-hidroxibenzoico por las enzimas descarboxilasas presentes en las BAL (Rodríguez y col., 2008). Los compuestos hidroxicinámicos aumentaron también durante la fermentación en estado sólido, si bien la fermentación en estado líquido no produjo cambios en la concentración de estos compuestos, con la excepción de la fermentación natural durante 96 h, que incrementó su contenido. El

aumento de ácidos hidroxicinámicos durante la fermentación de judía carilla con BAL ha sido previamente descrito por Dueñas y col. (2005). Los niveles de catequinas disminuyeron significativamente tras la fermentación tanto en estado sólido como líquido, hasta alcanzar niveles no detectables en el caso de la fermentación sólida. La disminución de las catequinas en forma monomérica podría explicarse por su polimerización durante el proceso de fermentación para dar lugar a la formación de procianidinas poliméricas que no se detectaron en las condiciones analíticas empleadas en este trabajo. El contenido en flavanonas no se modificó durante la fermentación en estado sólido, si bien la concentración de flavonoles se redujo significativamente por debajo del límite de detección. La disminución de ambas familias de compuestos durante la fermentación de soja con *B. subtilis* ha sido también observada recientemente (Dueñas y col., 2012). Los ingredientes obtenidos mediante fermentación líquida mostraron un menor contenido de flavanonas y flavonoles que los obtenidos a partir de judía no fermentada, debido a su catabolismo por parte de las BAL, como ha sido previamente demostrado (Tabasco y col., 2011). No se observaron antocianinas en ninguno de los extractos de judías pintas fermentadas, posiblemente debido a su degradación durante el proceso de fermentación.

Otro de los aspectos estudiados en esta Tesis Doctoral fue la proteólisis producida en los ingredientes fermentados derivados de judía y lenteja, ya que se ha demostrado que durante la fermentación de leguminosas como la soja se pueden liberar péptidos bioactivos por acción de las proteasas microbianas (Shin y col., 2001; Wang y col., 2013). Los niveles de proteólisis durante la fermentación de lentejas castellanas se evaluaron mediante la determinación de los grupos amino libres liberados durante el proceso. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto un aumento significativo de los grupos amino libres después de la fermentación líquida, tanto natural como inducida, si bien la hidrólisis proteica fue significativamente superior en la primera. En cambio, la fermentación con *B. subtilis* ocasionó un ligero aumento en la liberación de grupos amino libres, pero no fue significativo. Estos resultados fueron inesperados ya que *B. subtilis* se caracteriza por una alta capacidad hidrolítica sobre las proteínas de leguminosas (Sarkar y col., 1993; Chantawannakul y col., 2002). Sin embargo, el tratamiento de autoclavado al que se sometió a las semillas previamente a su fermentación podría ser el responsable de la baja hidrólisis de proteínas observada durante la fermentación en estado sólido. Se ha descrito

que las globulinas oligoméricas, que constituyen las proteínas mayoritarias de las legumbres, se disocian en sus correspondientes monómeros cuando son sometidas a tratamiento térmico y, posteriormente, se reagregan formando complejos de alto peso molecular estabilizados por interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro, disminuyendo su susceptibilidad a la proteólisis (Carbonaro y col., 2014). Estos autores han observado que tras el autoclavado de leguminosas se forman agregados intermoleculares entre las estructuras secundarias de lámina  $\beta$ , muy abundantes en leguminosas, fenómeno que explicaría la baja proteólisis observada en los ingredientes de lenteja castellana obtenidos por fermentación con *B. subtilis*. En judías pintas, la fermentación líquida también ocasionó mayor liberación de péptidos que la realizada en estado sólido, aunque en esta última se observó un aumento significativo en el contenido de péptidos tras 48 y 96 h de fermentación con respecto a la judía no fermentada. El aumento de la producción de péptidos durante la fermentación sólida sólo se observó en la judía, y no en la lenteja, fenómeno que puede atribuirse a que la susceptibilidad a la hidrólisis de la faseolina, proteína mayoritaria en judías, aumenta con la desnaturalización, a diferencia de lo que ocurre en otras globulinas de legumbres (Deshpande y Damodaran, 1989; Carbonaro y col., 2014) siendo, por tanto, más fácil su hidrólisis por las proteasas de *B. subtilis*. En cambio en lentejas, la desnaturalización producida durante el autoclavado conduciría a una resistencia a la hidrólisis de las globulinas por las proteasas de esta bacteria.

Una vez evaluado el efecto de la fermentación en la formación de compuestos bioactivos en los ingredientes derivados de lenteja y judía, el siguiente objetivo consistió en estudiar las propiedades bioactivas de estos ingredientes centrándonos en la evaluación de las actividades antioxidante e inhibidora de la ECA. Los resultados revelaron un aumento de la actividad antioxidante de los ingredientes de lenteja tras la fermentación natural realizada durante 48 h, aunque al aumentar la duración del proceso a 96 h no se mejoró la actividad antioxidante de los extractos. En cambio, la fermentación con *L. plantarum* durante 48 o 96 h no causó cambios significativos en la actividad antioxidante de los ingredientes, si bien a las 96 h estos extractos presentaron una actividad antioxidante más elevada que los obtenidos mediante fermentación natural. La fermentación con *B. subtilis* no produjo cambios significativos en la actividad antioxidante de los ingredientes de lenteja, que fue inferior a la de los extractos obtenidos mediante fermentación líquida. En la judía, por el contrario, la fermentación con *B. subtilis* durante



48 y 96 h ocasionó un notable incremento de la actividad antioxidante. Los ingredientes así obtenidos presentaron mayor actividad antioxidante que los obtenidos mediante fermentación líquida con BAL, en la que sólo se observaron diferencias significativas en la actividad antioxidante durante 48 h de fermentación natural. El aumento de los niveles de ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos, cuya capacidad atrapadora de radicales de oxígeno ha sido recientemente descrita (Koroleva y col., 2014), podría explicar en parte el aumento de la actividad antioxidante en los extractos de judía obtenidos mediante fermentación sólida. Los resultados observados en la judía fermentada están de acuerdo con los obtenidos por Fernández-Orozco y col. (2007), quienes observaron que la fermentación de soja con *B. subtilis* condujo a un aumento más pronunciado de la actividad antioxidante de esta leguminosa que la fermentación natural. Sin embargo, estos resultados difieren sustancialmente de los observados en la lenteja. Las diferencias en actividad antioxidante entre diferentes leguminosas fermentadas sugieren que los compuestos antioxidantes experimentan diferentes modificaciones durante el proceso de fermentación, que van a depender de la composición de la leguminosa, del tipo de microorganismo implicado en la fermentación, de las condiciones de fermentación y del método de preparación de los extractos en los que se determina la actividad antioxidante. Tanto los péptidos liberados durante la fermentación por acción de las proteasas bacterianas como los compuestos fenólicos presentes en las leguminosas pueden contribuir a la actividad atrapadora de radicales peróxido determinada mediante el método ORAC. Así mismo, otros compuestos antioxidantes como las vitaminas y la melatonina formados durante la fermentación podrían contribuir a la actividad antioxidante global de los ingredientes fermentados de lenteja.

Con el fin de establecer la contribución de ambos compuestos en la actividad antioxidante de los ingredientes fermentados de judía y lenteja se evaluó si existía correlación entre ellos. El alto coeficiente de correlación observado en los ingredientes de judía entre la concentración de compuestos fenólicos solubles y la actividad antioxidante ( $r=0,94$ ) sugiere la gran contribución de estos compuestos en la actividad antioxidante de los extractos, fenómeno no observado para la lenteja, donde se encontró una correlación negativa. Los compuestos fenólicos son considerados antioxidantes naturales, si bien la capacidad de atrapar radicales mediante mecanismos de donación de átomos de hidrógeno depende en gran medida de su estructura química (Kurek-Górecka y col., 2014)

y del número y posición de grupos hidroxilo en su estructura (Jing y col., 2012). De ahí que las diferencias en la composición fenólica entre los ingredientes de lenteja y la judía fermentadas podrían explicar la diferente correlación encontrada entre el contenido de compuestos fenólicos y los valores de ORAC.

Con el objeto de conocer qué compuestos fenólicos están principalmente implicados en la actividad antioxidante de los ingredientes fermentados, se realizó un análisis de componentes principales con los resultados obtenidos para los extractos de judías fermentadas. Este análisis indicó que los compuestos no flavonoideos (ácidos hidroxibenzoicos y compuestos hidroxicinámicos) se correlacionaron positivamente con la actividad antioxidante de los extractos. Estos resultados están de acuerdo con los observados por Dueñas y col. (2007), quienes encontraron una elevada correlación entre el contenido de ácido *p*-hidroxibenzoico y ácido *trans-p*-coumaroil-málico y la actividad antioxidante de lentejas fermentadas.

El bajo grado de proteólisis observado durante la fermentación de judía en estado sólido sugiere que el aumento de la actividad antioxidante de los ingredientes así obtenidos no puede ser atribuida a la formación de péptidos antioxidantes durante el proceso. Esta hipótesis fue corroborada por la correlación negativa ( $r=-0,77$ ) observada entre los valores de ORAC y el contenido de péptidos.

El último objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral fue la evaluación de la actividad inhibidora de la ECA en los ingredientes de lenteja y judía fermentadas ya que, como se ha explicado en la introducción, esta enzima está implicada en la regulación de la presión sanguínea. La obtención de alimentos con elevada actividad inhibidora de la ECA constituiría un método económico y eficaz de reducir la presión sanguínea. En lenteja, los resultados revelaron que la fermentación natural causó un aumento de la actividad inhibidora de la ECA, desde valores de inhibición del 67% en los ingredientes no fermentados hasta valores superiores al 90% en las fermentaciones llevadas a cabo durante 48 y 96 h. La fermentación de lentejas castellanas con *L. plantarum* proporcionó ingredientes con una actividad inhibidora de la ECA significativamente superior a las 48 h, si bien no se observaron diferencias significativas entre los dos tipos de fermentación a las 96 h. La fermentación con *B. subtilis* también causó un aumento de la actividad inhibidora de esta enzima, pero ésta fue muy inferior a la encontrada en los ingredientes

obtenidos mediante fermentación con BAL. En judías pintas, en cambio, la actividad inhibidora de la ECA fue muy elevada en los ingredientes no fermentados (88-96%), fenómeno que puede atribuirse al alto contenido en compuestos fenólicos de las semillas, como se ha discutido anteriormente, resultados también observados por Juan y col. (2010) en extractos acuosos de soja. La fermentación natural durante 48 y 96 h causó una disminución ligera aunque significativa de la actividad inhibidora de la ECA en los ingredientes de judía, mientras que los obtenidos con *L. plantarum* sólo mostraron valores significativamente más bajos a las 96 h de fermentación. En ambos casos, no obstante, se obtuvieron ingredientes con actividad inhibidora de la ECA superiores al 90%. La fermentación con *B. subtilis*, sin embargo, causó una importante reducción de la actividad inhibidora de esta enzima, hasta valores del 34% tanto a las 48 h como a las 96 h. La mejora de la actividad inhibidora de la ECA de los extractos de lenteja tras la fermentación líquida podría estar relacionada con la producción de péptidos con esta actividad, en vista de la elevada actividad proteolítica de las BAL observada durante el proceso. Estos resultados son novedosos ya que se han obtenido por primera vez extractos hidrosolubles de lentejas castellanas con potencial actividad antihipertensiva mediante fermentación con BAL. En judías pintas, en cambio, el bajo grado de proteólisis observado sugiere que la liberación de péptidos no sería la responsable de la elevada actividad inhibidora de la ECA de los ingredientes obtenidos mediante fermentación en estado líquido, pareciendo estar relacionada más bien con la composición fenólica específica de estos extractos. El análisis de componentes principales confirmó esta hipótesis, ya que el contenido de catequinas se correlacionó positivamente con la actividad inhibidora de la ECA de estos ingredientes. En este sentido, se ha descrito que los compuestos flavonoides, debido a su estructura, son potentes inhibidores de la ECA (Guerrero y col., 2012). Los resultados obtenidos en judías y lentejas pusieron de manifiesto que con la fermentación con *B. subtilis* se obtienen ingredientes con baja actividad inhibidora de la ECA. Estos resultados difieren de los obtenidos por Juan y col., (2010) que encontraron un aumento muy pronunciado de la actividad inhibidora de esta enzima tras la fermentación de la soja con *B. subtilis* a 40°C durante 18 h. Esta bacteria produce diversas proteasas, como las serín proteasas alcalinas y proteasas neutras (Çalík y col., 1998). La hidrólisis de las proteínas por estas enzimas con la consiguiente producción de péptidos de cadena corta ha sido sugerida como una de las principales

causas responsables del aumento de la actividad inhibidora de la ECA observada en extractos acuosos de soja fermentada (Okamoto y col., 1995; Kuba, 2003; Juan y col., 2010). Sin embargo, la baja proteólisis observada durante la fermentación sólida de lentejas y judías sugiere que la producción de péptidos bioactivos no es la responsable de la alta actividad inhibidora de la ECA observada. La heterogeneidad en la composición de proteínas de las leguminosas analizadas y las diferentes condiciones de fermentación empleadas explicarían las diferencias en la producción de péptidos inhibidores de la ECA en los diversos estudios. Por otro lado, la existencia de enzimas  $\beta$ -glucosidasas, tanasas y esterases ha sido previamente descrita en algunas cepas de *B. subtilis* (Kuo y col., 2006, 2012; Jana y col., 2013; Gall y col., 2014). La biotransformación de los compuestos fenólicos por estas enzimas a compuestos con actividad inhibidora de la ECA podría contribuir al aumento de esta actividad en los extractos de lentejas obtenidos mediante fermentación sólida. En cambio, en los ingredientes de judía fermentados se observó una correlación positiva entre los flavonoles y las catequinas con la actividad inhibidora de la ECA. El contenido de ambos compuestos disminuyó durante la fermentación con *B. subtilis* a 48 y 96 h hasta niveles no detectables, hecho que explicaría la disminución de la actividad inhibidora de la ECA observada en estos ingredientes.

Estos resultados ponen de manifiesto que mediante la fermentación en estados líquido y sólido de lentejas castellanas y judías pintas se pueden conseguir ingredientes con potenciales propiedades antihipertensivas que pueden utilizarse para la elaboración de alimentos funcionales para la prevención y control de la presión arterial.



---

## CONCLUSIONES

---





## 6. Conclusiones

- 1 El tipo de elicitor (ácido ascórbico, ácido fólico, ácido glutámico, quitosanos y ácido glutámico con quitosanos) y el tiempo de germinación a 20°C, en oscuridad y un 95% de humedad relativa afectó de forma diferente al contenido de GABA, compuestos fenólicos totales y a las actividades antioxidante e inhibidora de la ECA de los germinados de judía pinta.
- 2 El tratamiento con ácido ascórbico, ácido fólico, ácido glutámico, quitosanos y ácido glutámico con quitosanos durante 8 días no modificó el patrón de las proteínas de almacenamiento durante la germinación ni el perfil peptídico en los germinados de judía pinta.
- 3 El tratamiento con ácido glutámico durante 8 días fue el más efectivo en la acumulación de GABA y compuestos fenólicos totales en los germinados de judía pinta. Por otro lado, este elicitor aumentó la actividad inhibidora de la ECA y no mostró un efecto positivo en la actividad antioxidante.
- 4 La aplicación de ácido ascórbico, ácido fólico o ácido glutámico modificó el contenido, composición y actividad inhibidora de la ECA de los compuestos fenólicos en los germinados de judía pinta a los 8 días. Todos los elicitores ocasionaron una disminución de la concentración de compuestos fenólicos libres, aunque se observó la acumulación específica de algunos glucósidos de flavanonas y flavonoles y una mejora de la actividad inhibidora de la ECA, sobre todo con la aplicación de ácido fólico.
- 5 La fermentación en estados líquido y sólido de lentejas castellanas y judías pintas favoreció sus propiedades antihipertensivas potenciales aunque tuvieron diferente influencia sobre el contenido de GABA, compuestos fenólicos totales, péptidos solubles y en las actividades antioxidante e inhibidora de la ECA.
- 6 La fermentación líquida natural de lentejas castellanas fue el proceso más eficaz para maximizar el potencial antihipertensivo al producir la mayor síntesis de GABA, péptidos solubles y elevadas actividades antioxidante e inhibidora de la ECA.

- 7 La fermentación sólida de judías pintas mejoró el contenido de compuestos fenólicos solubles, de ácidos fenólicos y la actividad antioxidante, mientras que la fermentación líquida causó un aumento del contenido de GABA, de derivados hidroxicinámicos y de la actividad inhibidora de la ECA.

---

## BIBLIOGRAFÍA

---



## 7. Bibliografía

- Abete, I., Parra, D., Martinez, J. A. (2009). Legume, fish or high protein based hypocaloric diets: effects on weight loss and mitochondrial oxidation in obese men. *Journal of Medicinal Food*, 12, 100–108.
- Abeysekara, S., Chilibeck, P.D., Vatanparast, H., Zello, G.A. (2012). A pulse-based diet is effective for reducing total and ldl-cholesterol in older adults. *British Journal of Nutrition*, 108, S103–110.
- Acharya, K.R., Sturrock, E.D., Riordan, J.F., Ehlers, M.R. (2003). ACE revisited: a new target for structure-based drug design. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2, 891–902.
- Acosta-Estrada, B., Gutiérrez-Urbe, J. A., Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46-55.
- Adlam, D., Bendall, J.K., De Bono, J.P., Alp, N.J., Khoo, J., Nicoli, T., Yokoyama, M., Kawashima, S., Channon, K.M. (2007). Relationships between nitric oxide-mediated endothelial function, eNOS coupling and blood pressure revealed by eNOS-GTP cyclohydrolase 1 double transgenic mice. *Experimental Physiology*, 92, 119-126.
- Aguilera, Y., Dueñas, M., Estrella, I., Hernández, T., Benítez, V., Esteban, R.M., Martín-Cabrejas, M.A. (2010). Evaluation of phenolic profile and antioxidant properties of pardina lentil as affected by industrial dehydration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10101-10108.
- Aguilera, Y., Herrera, T., Benítez, V., Arribas, S.M., López De Pablo, A.L., Esteban, R.M., Martín-Cabrejas, M.A. (2015). Estimation of scavenging capacity of melatonin and other antioxidants: Contribution and evaluation in germinated seeds. *Food Chemistry*, 170, 203-211.



- Akihiro, T., Koike, S., Tani, R., Tominaga, T., Watanabe, S., Iijima, Y., Aoki, K., Shibata, D., Ashihara, H., Matsukura, C., Akama, K., Fujimura, T., Ezura, H. (2008). Biochemical mechanism on GABA accumulation during fruit development in tomato. *Plant & Cell Physiology*, 49, 1378-1389.
- Al Shukor, N., Van Camp, J., Gonzales, G.B., Staljanssens, D., Struijs, K., Zotti, M.J., Raes, K., Smagghe, G. (2013). Angiotensin-converting enzyme inhibitory effects by plant phenolic compounds: A study of structure activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 11832-11839.
- Allegheny, N., Z.A. Obanu, P. Campbell-Platt, J.D. Owens. (1996). Control of ammonia during *Bacillus subtilis* fermentation of legumes. *Food Microbiology*, 29, 321-333.
- Altorf-van der Kuil, W., Engberink, M.F., Brink, E.J., van Baak, M.A., Bakker, S.J.L., Navis, G., van't Veer, P., Geleijnse, J.M. (2010). Dietary Protein and Blood Pressure: A Systematic Review. *PLoS ONE*, 5, e12102.
- Amarowicz, R., Pegg, R.B. (2008). Legumes as a source of natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 865-878.
- Ampe, C., Van Damme, J., de Castro, A., Sampaio, M.J., Van Montagu, M., Vanderkerckhove, J. (1986). The amino acid sequence of the 2S sulfur-rich protein from seeds of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). *European Journal of Biochemistry*, 159, 597-604.
- Anderson, G.H. (1986). Proteins and amino acids: Effects on the sympathetic nervous system and blood pressure regulation. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 64, 863-870.
- Anderson, J.W., Major, A.W. (2002). Pulses and lipaemia, short- and long-term effect: Potential in the prevention of cardiovascular disease. *British Journal of Nutrition*, 88, S263-S271.
- Aoki, H., Uda, I., Tagami, K., Furuya, Y., Endo, Y., Fujimoto, K. (2003). The production of a new tempeh like fermented soybean containing a high level of  $\gamma$ -aminobutyric acid by anaerobic incubation with *Rhizopus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67, 1018-1023.

- Apple, L.J., Moore, T.J., Obarzanek, E., Vollmer, W.M., Svetkey, L.P., Sacks, F.M., Bray, G.A., Vogt, T.M., Cutler, J.A., Windhauser, M.M., Lin, P.H., Karanja, N. (1997). A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *New England Journal of Medicine*, 336, 1117-1124.
- Aranega-Bou, P., de la O Leyva, M., Finiti, I., García-Agustín, P., Gonzalez-Bosch, C. (2014). Priming of plant resistance by natural compounds. Hexanoic acid as a model. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1-12.
- Araujo, M., Wilcox, C. S. (2014). Oxidative stress in hypertension: role of the kidney. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20, 74-101.
- Arcan, I., Yemenicioglu, A. (2010). Effects of controlled pepsin hydrolysis on antioxidant potential and fractional changes of chickpea proteins. *Food Research International*, 43, 140-147.
- Aviram, M., Dornfeld, L. (2001). Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*, 158, 195-198.
- Azadbakht, L., Kimiagar, M., Mehrabi, Y., Esmailzadeh, A., Hu, F.B., Willett, W.C. (2007). Soy consumption, markers of inflammation and endothelial function: a crossover study in postmenopausal women with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*, 30, 967–973.
- Babu, K.R., Satyanarayana, T. (1996). Production of Bacterial Enzymes by Solid State Fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 55, 464-467.
- Baenas, N., García-Viguera, C., Moreno, D.A. (2014). Elicitation: A tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules*, 19, 13541-13563.
- Bai, Q., Chai, M., Gu, Z., Cao, X., Li, Y., Liu, K. (2009). Effects of components in culture medium on glutamate decarboxylase activity and  $\gamma$ -aminobutyric acid accumulation in foxtail millet (*Setaria italica* L.) during germination. *Food Chemistry*, 116, 152-157.

- Bamdad, F., Dokhani, Sh., Keramat, J., Zareie, R. (2009). The impact of germination and in vitro digestion on the formation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from lentil proteins compared to whey proteins. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 37, 36-46.
- Bartkiene, E., Krungleviciute, V., Juodeikiene, G., Vidmantiene, D., Maknickiene, Z. (2014). Solid state fermentation with lactic acid bacteria to improve the nutritional quality of lupin and soya bean. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. DOI 10.1002/jsfa.6827.
- Bartolomé, B., Estrella, I., Hernández, T. (1997). Changes in phenolic compounds in lentils (*Lens culinaris*) during germination and fermentation. *European Food Research and Technology*, 205, 290-294.
- Begley, M., Gahan, C.G., Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 625-651.
- Belski, R., Mori, T.A., Puddey, I.B., Sipsas, S., Woodman, R.J., Ackland, T.R., Beilin, L.J., Dove, E.R., Carlyon, N.B., Jayaseena, V., Hodgson, J.M. (2011). Effects of lupin-enriched foods on body composition and cardiovascular disease risk factors: a 12-month randomized controlled weight loss trial. *International Journal of Obesity*, 35, 810–819.
- Benítez, V., Cantera, S., Aguilera, Y., Mollá, E., Esteban, R. M., Díaz, M. F., Martín-Cabrejas, M. A. (2013). Impact of germination on starch, dietary fiber and physicochemical properties in non-conventional legumes. *Food Research International*, 50, 64–69.
- Binh, T.T.T., Ju, W.T., Jung, W.J., Park, R.D. (2014). Optimization of  $\gamma$ -amino butyric acid production in a newly isolated *Lactobacillus brevis*. *Biotechnology Letters*, 36, 93–98.
- Borden, L. A., Murali Dhar, T. G., Smith, K. E., Smith R. L., Weinshank, T. A., Branchek, C. G. (1994). Tiagabine, SK-and-F, 89976A, CI-996 and NNC-711 are selective for the cloned GABA transporter GAT-1. *European Journal of Pharmacology*, 269, 219-224.
- Borresen, E. C., Henderson, A. J., Kumar, A., Weir, T. L., Ryan, E. P. (2012). Fermented foods: Patented approaches and formulations for nutritional supplementation and health promotion. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 4, 134-140.

- Boschin, G., Scigliuolo, G. M., Resta, D., Arnoldi, A. (2014). ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. *Food Chemistry*, 145, 34-40.
- Bouche, N., Fromm, H. (2004). GABA in plants: just a metabolite? *Trends in Plant Science*, 9, 110-115.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I. B., Prajapati, J. B., Seto, Y., Schure, E. T., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijelaars, S., Hansen, E. B. (2012). Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 87-97.
- Brasier, A. R., Li, J. (1996). Mechanisms for inducible control of angiotensinogen gene transcription. *Hypertension*, 27, 465-75.
- Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) – Model food legumes. *Plant and Soil*, 252, 55–128.
- Burguieres, E., McCue, P., Kwon, Y. I., Shetty, K. (2007). Effect of vitamin C and folic acid on seed vigour response and phenolic-linked antioxidant activity. *Bioresource Technology*, 98, 1393-1404.
- Burguieres, E., Mccue, P., Kwon, Y.I., Shetty, K. (2008). Health-related functionality of phenolic-enriched pea sprouts in relation to diabetes and hypertension management. *Journal of Food Biochemistry*, 32, 3-14.
- Burris, R.L., Ng, H.P., Nagarajan, S. (2014). Soy protein inhibits inflammation-induced VCAM-1 and inflammatory cytokine induction by inhibiting the NF-kB and AKT signaling pathway in apolipoprotein E-deficient mice. *European Journal of Nutrition*, 53, 135-148.
- Çalík, P., Çalík, G., Özdamar, T. H., (1998). Oxygen transfer effects in serine alkalineprotease fermentation by *Bacillus licheniformis*: use of citric acid as the carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*, 23, 451-461.

- Capuccio, F. P., Kery, S. M., Micha, F. B., Plange-Rhule, J., Eastwood, J. B. (2006). A community programme to reduce salt intake and blood pressure in Ghana. *BMC Public Health*, 6, 13-17.
- Carbonaro, M., Maselli, P., Nucara, A. (2014). Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Research International* DOI: 10.1016/j.foodres.2014.11.007.
- Carrasco-Castilla, J., Hernandez-Alvarez, A. J., Jimenez-Martinez, C., Jacinto-Hernandez, C., Alaiz, M., Giron-Calle, J., Vioque, J., Davila-Ortiz, G. (2012). Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from *phaseolin* and bean protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 135, 1789-1795.
- Chang, C., Wang, B., Shi, L., Li, Y., Duo, L., Zhang, W. (2010). Alleviation of salt stress-induced inhibition of seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by ethylene and glutamate. *Journal of Plant Physiology*, 167, 1152–1156.
- Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E., Lumyong, S. (2002). Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *ScienceAsia*, 28, 241-245.
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F. (1995). Structural-analysis of antioxidative peptides from soybean beta-conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 574-578.
- Chen, J. R., Okada, T., Muramoto, K., Suetsuna, K., Yang, S. C. (2002). Identification of Angiotensin I-Converting Enzyme inhibitory peptides derived from the peptic digest of soybean protein. *Journal of Food Biochemistry*, 26, 543-554.
- Chen, Z. Y., Peng, C., Jiao, R., Wong, Y. M., Yang, N., Huang, Y. (2009). Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4485-4499.
- Chiang, S-S., Pan, T-M. (2011). Antiosteoporotic effects of *Lactobacillus*-fermented soy skim milk on bone mineral density and the microstructure of femoral bone in ovariectomized mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7734–7742.

- Chiasson, J. L., Josse, R. G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., Laakso, M., Grp, S.-N. T. R. (2003). Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance - The STOP-NIDDM Trial. *Journal of the American Medical Association*, 290, 486-494.
- Choi, H. D., Kim, S. S., Kim, K. T., Lee J. Y., Park, W. M. (2000). Effect of presoaking treatments on growth and rot of soybean sprouts. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 32, 584-589.
- Chung, I-M., Seo, S-H., Ahn, J-K., Kim, S-H. (2011). Effect of processing, fermentation, and aging treatment to content and profile of phenolic compounds in soybean seed, soy curd and soy paste. *Food Chemistry*, 127, 960–967.
- Cook, N. R., Cutler, J. A., Obarzanek, E., Buring, J. E., Rexrode, K. M., Kumanyika, S. K., Appel, L. J., Whelton, P. K. (2007). Long-term of dietary sodium reduction on cardiovascular disease outcomes; observational follow up of the trials of hypertension (TOHP). *British Medical Journal*, 334, 885-892.
- Cooper, W. O., Hernandez-Diaz, S., Arbogast, P. G., Dudley, J. A. (2006). Major congenital malformations after first-trimester exposure to ACE inhibitors. *New England Journal of Medicine*, 354, 2443–2453.
- Couto, S.R., Sanromán, M.A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry. A review. *Journal of Food Engineering*, 76, 291–302.
- Crowley, S. D. (2014). The cooperative roles of inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20, 102-120.
- Croy, R. R., Gatehouse, J. A., Tyler, M., Boulter, D. (1980). The purification and characterization of a third storage protein (convicilin) from the seeds of pea (*Pisum sativum* L.). *Biochemical Journal*, 191, 509-516.
- Cuadrado, C., Hajos, G., Burbano, C., Pedrosa, M.M., Ayet, G., Muzquiz, M., Pusztai, A., Gelencser, E. (2002). Effect of natural fermentation on the lectin content of lentils measured by immunological methods. *Food and Agricultural Immunology*, 14, 41–49.



- Da Silva, L. H., Celeghini, R. M. S., Chang Y. K. (2011). Effect of the fermentation of whole soybean flour on the conversion of isoflavones from glycosides to aglycones. *Food Chemistry*, 128, 640–644.
- Dajanta, K., Apichartsrangkoon, A., Chukeatirote, E. (2011). Antioxidant properties and total phenolics of Thua Nao (a Thai fermented soybean) as affected by *Bacillus*-fermentation. *Microbial & Biochemical Technology*, 3, 056-059.
- Dajanta, K., Janpum, P., Leksing, W. (2013). Antioxidant capacities, total phenolics and flavonoids in black and yellow soybeans fermented by *Bacillus subtilis*: A comparative study of Thai fermented soybeans (Thua Nao). *International Food Research Journal*, 20, 3125-3132.
- Darmawan, R., Bringe, N. A., de Mejia, E. G. (2010). Antioxidant capacity of alcalase hydrolysates and protein profiles of two conventional and seven low glycinin soybean cultivars. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 233-240.
- de Luis Román, D., Aller, R., Bustamante-Bustamante, J. (2008). Aspectos terapéuticos de la dieta en la hipertensión arterial. *Nefro Plus*, 1, 39-46.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A. (2013). Dietary polyphenolics in human health: Structures, Bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18, 1818-1892.
- Deshpande, S. S., Damodaran, S. (1989). Structure-digestibility relationship of legume 7S proteins. *Journal of Food Science*, 54, 108-113.
- Deshpande, S. S., Salunkhe, D. K., Oyewole, O. B., Azam-Ali, S., Battcock, M. Bressani, R. (2000). Fermented Grain Legumes, Seeds and Nuts. A Global Perspective. Rome, Italy: F.A.O.
- Di Cagno, R., Mazzacane, F., Rizzello, C. G., Angelis, M. D. E., Giuliani, G., Meloni, M., De Servi, B., Gobbetti, M. (2010). Synthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: functional grape must beverage and dermatological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 731-741.

- Diana, M., Quilez, J., Rafecas, M. (2014). Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a Review. *Journal of Functional Foods*, 10, 407-420.
- Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411, 843-847.
- Doblado, R., Frias, J., Muñoz, R., Vidal-Valverde, C. (2003). Fermentation of *Vigna sinensis* var. *carilla* Flours by Natural Microflora and Lactobacillus Species. *Journal of Food Protection*, 6, 2313-2320.
- Doblado, R., Frias, J., Vidal-Valverde, C. (2007). Changes in vitamin C content and antioxidant capacity of raw and germinated cowpea (*Vigna sinensis* var. *carilla*) seeds induced by high pressure treatment. *Food Chemistry*, 101, 918-923.
- Doblado, R., Zielinski, H., Piskula, M., Kozłowska, H., Muñoz, R., Frias, J., Vidal-Valverde, C. (2005). Effect of processing on the antioxidant vitamins and antioxidant capacity of *Vigna sinensis* Var. *Carilla*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1215-1222.
- Dogra, V., Ahuja, P.S., Sreenivasulu, Y. (2013). Change in protein content during seed germination of a high altitude plant *Podophyllum hexandrum* Royle. *Journal of Proteomics*, 78, 26-38.
- Doménech, M., Roman, P., Lapetra, J., García de la Corte, F. J., Sala-Vila, A., de la Torre, R., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Ruiz-Gutiérrez, V., Lamuela-Raventós, R. M., Toledo, E., Estruch, R., Coca, A., Ros, E. (2014). Mediterranean diet reduces 24-hour ambulatory blood pressure, blood glucose, and lipids: One-year randomized, clinical trial. *Hypertension*, 64 (1), 69-76.
- Donkor, O. N., Stojanovska, L., Ginn, P., Ashton, J., & Vasiljevic, T. (2012). Germinated grains-sources of bioactive compounds. *Food Chemistry*, 135, 950-959.
- Dueñas, M., Estrella, I., Hernández, T. (2004). Occurrence of phenolic compounds in the seed coat and the cotyledon of peas (*Pisum sativum* L.). *European Food Research and Technology*, 219, 116–123.

- Dueñas, M., Fernández, D., Hernández, T., Estrella, I., Muñoz, R. (2005). Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L). Modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 297-304.
- Dueñas, M., Hernández, T., Estrella, I. (2006). Assessment of in vitro antioxidant capacity of the seed coat and the cotyledon of legumes in relation to their phenolic contents. *Food Chemistry*, 98, 95–103.
- Dueñas, M., Hernández, T., Estrella, I. (2007). Changes in the content of bioactive polyphenolic compounds of lentils by the action of exogenous enzymes. Effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 101, 90–97.
- Dueñas, M., Hernández, T., Estrella, I., Fernández, D. (2009). Germination as a process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of lupin seeds (*Lupinus angustifolius* L.). *Food Chemistry*, 117, 599-607.
- Dueñas, M., Hernández, T., Robledo, S., Lamparski, G., Estrella, I., Muñoz, R. (2012). Bioactive phenolic compounds of soybean (*Glycine max* cv. Merit): Modifications by different microbiological fermentations. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, 62, 241-250.
- Dueñas, M., Sun, B., Hernández, T., Estrella, I., Spranger, M.I. (2003). Proanthocyanidin composition in the seed coat of lentils (*Lens culinaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7999-8004.
- Durak, A., Baraniak, B., Jakubczyk, A., Swieca, M. (2013). Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. *Food Chemistry*, 141, 2177-2183.
- Duranti, M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77, 67-82.
- Duranti, M., Gius, C. (1997). Legume seeds: Protein content and nutritional value. *Field Crops Research*, 53, 31-45.

- Egounlety, M., Aworh, O. C. (2003). Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms). *Journal of Food Engineering*, 56, 249–254.
- Ehlers, M. R. W., Gordon, K., Schwager, S. L. U., Sturrock, E. D. (2012). Shedding the load of hypertension: The proteolytic processing of angiotensin-converting enzyme. *South African Medical Journal*, 102, 461-464.
- El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I., Daayf, F. (2010). Chitosan in plant protection. *Marine Drugs*, 8, 968–987.
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 430-441.
- Elliott, P., Stamler, J., Dyer A. R., Appel, L., Dennis, B., Kesteloot, H., Ueshima, H., Okayama A., Chan, Q., Garside, D. B., Zhou, B. (2006). Association between protein intake and blood pressure: the INTERMAP study. *Archives of Internal Medicine*, 166, 79–87.
- Erdmann, K., Cheung, B. W. Y., Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 643-654.
- Eyster, K. M., Breitkopf, N. P., Martin, D. S. (2012). Antihypertensive activity of soy and soy-derived compounds. In *Soy: Nutrition, Consumption and Health*. Ahmad, A. (eds). Hauppauge, NY: Nova Science Publisher, p. 79-104.
- Fan, J., Hu, X., Tan, S., Zhang, Y., Tatsumi, E., Li. L. (2009). Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide derived from douche, a traditional Chinese fermented soybean food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 603-608.
- Féletou, M., Huang, Y., Vanhoutte, P. M. (2011). Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *British Journal of Pharmacology*, 164, 894–912.

- Fercha, A., Capriotti, A. L., Caruso, G., Cavaliere, C., Samperi, R., Stampachiacchiere, S., Laganà, A. (2014). Comparative analysis of metabolic proteome variation in ascorbate-primed and unprimed wheat seeds during germination under salt stress. *Journal of Proteomics*, 108, 238-257.
- Fernandez-Orozco, R., Frias, J., Muñoz, R., Zielinski, H., Piskula, M.K., Kozłowska, H., Vidal-Valverde, C. (2008). Effect of fermentation conditions on the antioxidant capacity of *Lupinus angustifolius* cv. Zapaton. *European Food Research and Technology*, 227, 979–988.
- Fernández-Orozco, R., Frias, J., Muñoz, R., Zielinski, h., Piskula, M. K., Kozłowska, H. (2007). Fermentation as a bio-process to obtain functional soybean flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8972-8979.
- Fernández-Orozco, R., Frias, J., Zielinski, H., Muñoz, R., Piskula, M. K., Kozłowska, H., Vidal-Valverde, C. (2009). *LWT-Food Science and Technology*, 42, 885-892.
- Fernández-Orozco, R., Piskula, M. K., Zielinski, H., Kozłowska, H., Frias, J., Vidal-Valverde, C. (2006). Germination as a process to improve the antioxidant capacity of *Lupinus angustifolius* L. var. Zapaton. *European Food Research and Technology*, 223, 495-502.
- Ferrario, C. M. (2006). Role of angiotensin II in cardiovascular disease –Therapeutic implications of more than a century of research. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 7, 3-14.
- Ferreira, L. R., Alves Macedo, J., Lima Ribeiro, M., Alves Macedo, G. (2013). Improving the chemopreventive potential of orange juice by enzymatic biotransformation. *Food Research International*, 51, 526–535.
- Frias, J., Diaz-Pollan, C., Hedley, C.L., Vidal-Valverde, C. (1995). Evolution of trypsin inhibitor activity during germination of lentils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2231–2234.

- Frias, J., Diaz-Pollan, C., Hedley, C.L., Vidal-Valverde, C. (1996a). Evolution and kinetics of monosacharide, disaccharide and  $\alpha$ -galactosides during germination of lentils. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 202, 35–39.
- Frias, J., Miranda, M. L., Doblado, R., Vidal-Valverde, C. (2005). Effect of germination and fermentation on the antioxidant vitamin content and antioxidant capacity of *Lupinus albus* L. var. Multolupa. *Food Chemistry*, 92, 211-220.
- Frias, J., Song, Y. S., Martínez-Villaluenga, C., González de Mejia, E., Vidal-Valverde, C. (2008). Immunoreactivity and amino acid content of fermented soybean products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 99–105.
- Frias, J., Vidal-Valverde, C., Kozłowska, H., Tabera, J., Honke, J., Hedley, C. L. (1996b). Natural fermentation of lentils. Influence of time, flour concentration, and temperature on the kinetics of monosaccharides, disaccharides and  $\alpha$ -galactosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 579–584.
- Gall, M. G., Nobili, A., Pavlidis, I. V., Bornscheuert, U. T. (2014). Improved thermostability of a *Bacillus subtilis* esterase by domain exchange. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 1719–1726.
- Garcia-Mora, P., Peñas, E., Frias, J., Gomez, R., Martinez-Villaluenga, C. (2015). High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. *Food Chemistry*, 171, 224-232.
- Garcia-Mora, P., Peñas, E., Frias, J., Martínez-Villaluenga, C. (2014). Savinase, the most suitable enzyme for releasing peptides from lentil (*Lens culinaris* var. Castellana) protein concentrates with multifunctional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 4166-4174.
- Geethanjali, S., Subash, A. (2011). Optimization of protease production of *Bacillus subtilis* isolated from mid gut of fresh water fish *Labeo rohita*. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 3, 88-95.



- Ghavidel, R.A., Prakash, J. (2007). The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, *in vitro* iron and calcium bioavailability and *in vitro* starch and protein digestibility of some legume seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 1292-1299.
- Gibbs, B. F., A. Zougman, R. Masse and C. Mulligan. (2004). Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International*, 37, 123-131.
- Granito, M., Frias, J., Doblado, R., Guerra, M., Champ, M., Vidal-Valverde, C. (2002). Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*) by natural fermentation. *European Food Research and Technology*, 214, 226-231.
- Granito, M., Michel, C., Frias, J., Champ, M., Guerra, M. (2005b). Fermented *Phaseolus vulgaris*: acceptability and intestinal effects. *European Food Research and Technology*, 220, 182-186.
- Granito, M., Torres, A., Frias, J., Guerra, M. (2005a). Influence of fermentation on the nutritional value of two varieties of *Vigna sinensis*. *European Food Research and Technology*, 220, 176-181.
- Gravel, K., Lemieux, S., Asselin, G., Dufresne, A., Lemay, A., Forest, J-C., Dodin, S. (2010). Effects of pulse consumption in women presenting components of the metabolic syndrome: a randomized controlled trial. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3, 143–151.
- Grewal, A., Jood, S. (2006). Effect of processing treatments on nutritional and antinutritional contents of green gram. *Journal of Food Biochemistry*, 30, 535–546.
- Griendling, K. K., Minieri, C. A., Ollerenshaw, J. D., Alexander, R. W. (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, 74, 1141-1148.
- Grosso, G., Mistretta, A., Frigiola, A., Gruttadauria, S., Biondi, A., Basile, F., Vitaglione, P., D'Orazio, N., Galvano, F. (2014). Mediterranean Diet and Cardiovascular Risk Factors: A Systematic Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 593-610.

- Gu, Y., Wu, J. (2013). LC-MS/MS coupled with QSAR modeling in characterising of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean proteins. *Food Chemistry*, 141, 2682-2690.
- Guajardo-Flores, D., Serna-Saldívar, S., O., Gutiérrez-Urbe, J. A. (2013). Evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities of extracted saponins and flavonols from germinated black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 141, 1497–1503.
- Guang, C., Phillips, R. D. (2009). Plant food-derived angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5113–5120.
- Guerrero, L., Castillo, J., Quiñones, M., Garcia-Vallvé, S., Arola, L., Pujadas, G., Muguerza, B. (2012). Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme Activity by Flavonoids: Structure-Activity Relationship Studies. *PLoS ONE*, 7, e49493.
- Gulewicz, P., Martinez-Villaluenga, C., Frias, J., Ciesiolka, D., Gulewicz, K, Vidal-Valverde, C. (2008). Effect of germination on the protein fraction composition of different lupin seeds. *Food Chemistry*, 107, 830-844.
- Guo, Y., Yang, R., Chen, H., Song, Y., Gu, Z. (2012). Accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid in germinated soybean (*Glycine max* L.) in relation to glutamate decarboxylase and diamine oxidase activity induced by additives under hypoxia. *European Food Research and Technology*, 234, 679-687.
- Gupta, R., & Dhillon, S. (1993). Characterization of seed storage proteins of Lentil (*Lens culinaris* M.). *Annals of Biology*, 9, 71–78.
- Hall, J. E., Granger, J. P., do Carmo, J. M., da Silva, A. A., Dubinion, J., George, E., Hamza, S., Speed, J., Hall, M. E. (2012). Hypertension: Physiology and Pathophysiology. *Comprehensive Physiology*, 2, 2393-2442.
- Hanson, M.G., Zahradka, P., Taylor, C.G. (2014). Lentil-based diets attenuate hypertension and large-artery remodelling in spontaneously hypertensive rats. *The British Journal of Nutrition*, 111, 690-698.

- Hardeep, S. G., Mamta, A., Paras, S., Jaspreet, S. (2011). Phenolic content and Antioxidant activity of germinated and cooked pulses. *International Journal of Food Properties*, 14, 1366–1374.
- Harrison, D. G., Gongora, M. C., Guzik, T. J., Widder, J. (2007). Oxidative stress and hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension*, 1, 30-44.
- Harrison, D. G., Guzik, T.J., Lob, H. E., Madhur, M. S., Marvar, P. J., Thabet, S.R., Vinh, A., Weyand, C. M. (2011). Inflammation, immunity, and hypertension. *Hypertension*, 57, 132-140.
- Hayakawa, K., Kimura, M., Kasaha, K., Matsumoto, K., Sansawa, H., Yamori, Y. (2004). Effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *The British Journal of Nutrition*, 92, 411-417.
- He, J., Gu, D., Wu, X., Chen, J., Duan, X., Chen, J., Whelton, P. K. (2005). Effect of soybean protein on blood pressure: A randomized, controlled trial. *Annals of Internal Medicine*, 143, 1-9.
- Hermisdorff, H. H., Zulet, M. A., Abete, I., Martinez, J. A. (2011). A legume-based hypocaloric diet reduces proinflammatory status and improves metabolic features in overweight/obese subjects. *European Journal of Nutrition*, 50, 61–69.
- Hernández-Ledesma, B., Contreras, M. M., Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165, 23-35.
- Hong, K. J., Lee, C. H., Kim, S. W. (2004). *Aspergillus oryzae* GB-107 Fermentation Improves Nutritional Quality of Food Soybeans and Feed Soybean Meals. *Journal of Medicinal Food*, 7, 430–435.
- Horvath, K., Jeitler, K., Siering, U., Stich, A.K., Skipka, G., Gratzner, T. W. (2008). Long term effects of weight reducing interventions in hypertensive patients. *Archives of Internal Medicine*, 168, 571-580.

- Hu, F. B. (2011). Do functional foods have a role in the prevention of cardiovascular disease? *Circulation*, 124, 538-540.
- Huang, X., Cai, W., Xu, B. (2014). Kinetic changes of nutrients and antioxidant capacities of germinated soybean (*Glycine max* L.) and mung bean (*Vigna radiata* L.) with germination time. *Food Chemistry*, 143, 268–276.
- Hubert, J., Berger, M., Nepveu, F., Paul, F., Daydé, J. (2008). Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. *Food Chemistry*, 109, 709–721.
- Ilumire, T., Kihara, M., Hirota, N., Zhou, T., Hayashi, K., Ito, K. (2009). A method for production of  $\gamma$ -amino butyric acid (GABA) using barley bran supplemented with glutamate, *Food Research International*, 42, 319-323.
- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., Sansawa, H. (2003). Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, 490-495.
- Iritani, N., Sugimoto, T., Fukuda, H., Komiya, M., Ikeda, H. (1997). Dietary soybean protein increases insulin receptor gene expression in Wistar fatty rats when dietary polyunsaturated fatty acid level is low. *Journal of Nutrition*, 127, 1077-1083.
- Ishibashi, Y., Iwaya-Inoue, M. (2006). Ascorbic acid suppresses germination and dynamic states of water in wheat seeds. *Plant Production Science*, 9, 172-175.
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P., Darewicz, M. (2014). Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 114-134.
- Jana, A., Maity, C., Halder, S. K., Mondal, K. C., Pati, B. R., Das Mohapatra, P. K. (2013). Enhanced tannase production by *Bacillus subtilis* PAB2 with concomitant antioxidant production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2, 363–371.

- Jayalath, V. H., De Souza, R. J., Sievenpiper, J. L., Ha, V., Chiavaroli, L., Mirrahimi, A., Di Buono, M., Bernstein, A. M., Leiter, L.A., Kris-Etherton, P. M., Vuksan, V., Beyene, J., Kendall, C. W. C., Jenkins, D. J. A. (2014). Effect of dietary pulses on blood pressure: A systematic review and meta-analysis of controlled feeding trials. *American Journal of Hypertension*, 27, 56-64.
- Jayaraj, J., Rahman, M., Wan, A., Punja, Z. K. (2009). Enhanced resistance to foliar fungal pathogens in carrot by application of elicitors. *Annals of Applied Biology*, 155, 71-80.
- Jenkins, D. J., Kendall, C. W., Augustin, L. S., Mitchell, S., Sahye-Pudaruth, S., Blanco Mejia, S., Chiavaroli, L., Mirrahimi, A., Ireland, C., Bashyam, B., Vidgen, E., de Souza R. J., Sievenpiper, J. L., Coveney, J., Leiter, L. A., Josse, R.G. (2012). Effect of legumes as part of a low glycemic index diet on glycemic control and cardiovascular risk factors in type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *Archives of Internal Medicine*, 172, 1653–1660.
- Jimenez, N., Esteban-Torres, M., Mancheño, J. M., De las Rivas, B., Muñoz, R. (2014). Tannin degradation by a novel tannase enzyme present in some *Lactobacillus plantarum* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 2991-2997.
- Jin, A., Ozga, J.A., Lopes-Lutz, D., Schieber, A., Reinecke, D. M. (2012). Characterization of proanthocyanidins in pea (*Pisum sativum* L.), lentil (*Lens culinaris* L.), and faba bean (*Vicia faba* L.) seeds. *Food Research International*, 46, 528-535.
- Jing, P., Zhao, S. J., Jian, W. J., Qian, B. J., Dong, Y., Pang, J. (2012). Quantitative studies on Structure-DPPH• scavenging activity relationships of food phenolic acids. *Molecules*, 17, 12910-12924.
- Juan, M. Y., Wu, C. H., Chou, C. C. (2010). Fermentation with *Bacillus* spp. as a bioprocess to enhance anthocyanin content, the angiotensin converting enzyme inhibitory effect, and the reducing activity of black soybeans. *Food Microbiology*, 27, 918-923.

- Juan, M-Y., Chou, C-C. (2010). Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC14715. *Food Microbiology*, 27, 586-591.
- Juodeikiene, G., Bartkiene, E., Viskelis, P., Urbonaviciene, D., Eidukonyte, D., Bobinas, C. (2012). Fermentation processes using lactic acid bacteria producing bacteriocins for preservation and improving functional properties of food products. *Advances in Applied Biotechnology*. Marian Petre (eds.). <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/26396.pdf>.
- Khalil, M.M. (2001). Effect of soaking, germination, autoclaving and cooking on chemical and biological value guar compared with faba bean. *Nahrung/Food*, 45, 246-250.
- Khandelwal, S., Upidi, S.A., Ghugre, P. (2010). Polyphenols and tannins in Indian pulses: Effect of soaking, germination and pressure cooking. *Food Research International*, 43, 526-530.
- Khurana, S., Venkataraman, K., Hollingsworth, A., Piche, M., Tai, T. C. (2013). Polyphenols: Benefits to the cardiovascular system in health and in aging. *Nutrients*, 5, 3779-3827.
- Kiers, J. L., Van Laeken, A. E. A., Rombouts, F. M., Nout, M. J. R. (2000). *In vitro* digestibility of *Bacillus* fermented soya bean. *International Journal of Food Microbiology*, 60, 163-169.
- Kim, D.-K., Jeong, S. C., Gorinstein, S., Chon, S.-U. (2012). Total polyphenols, antioxidant and antiproliferative activities of different extracts in mungbean seeds and sprouts. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67, 71–75.
- Kim, E. H., Kim, S. H., Chung, J. J., Chi, H. Y., Kim, J. A., Chung, I. M. (2006). Analysis of phenolic compounds and isoflavones in soybean seeds (*Glycine max* (L.) and sprouts grown under different conditions. *European Food Research Technology*, 222, 201-208.
- Kim, H.S., Lee, E.J., Lim, S.T., Han, J.A. (2015). Self-enhancement of GABA in rice bran using various stress treatments. *Food Chemistry*, 172, 657-662.



- Kitano-Okada, T., Ito, A., Koide, A., Nakamura, Y., Han, K.H., Shimada, K., Sasaki, K., Ohba, K., Sibayama, S., Fukushima, M. (2012). Anti-obesity role of adzuki bean extract containing polyphenols: *In vivo* and *in vitro* effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2644-2651.
- Kitiyakara, C., Wilcox, C. S. (1998). Antioxidants for hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 7, 531–538.
- Kodera, T., Nio, N. (2006). Identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from protein hydrolysates by a soybean protease and the antihypertensive effects of hydrolysates in spontaneously hypertensive model rats. *Journal of Food Science*, 71, C164-C173.
- Koehler, P., Hartmann, G., Wieser, H., Rychlik, M. (2007). Changes of folates, dietary fiber, and proteins in wheat as affected by germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4678-4683.
- Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., Monose, H., Kimura, T. (2005). Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiology*, 22, 497-504.
- Kong, B., Xiong, Y. L. (2006). Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6059-6068.
- Koroleva, O., Torkova, A., Nikolaev, I., Khrameeva, E., Fedorova, T., Tsentelovich, M., Amarowicz, R. (2014). Evaluation of the antiradical properties of phenolic acids. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 16351-16380.
- Koshiyama, I. (1983). Storage proteins of soybean. *In: Seed Proteins. Biochemistry, Genetics, Nutritive Value*; Gottschalk, W., Miller, H.P., (eds.), Martinus Nijhoff/Dr. W. The Hague: Junk Publisher. 427-450.
- Kotilainen, L., Rajalahti, R., Ragasa, C., Pehu, E. (2006). Health enhancing foods: Opportunities for strengthening the sector in developing countries. Discussion Paper 30. Washington, DC: World Bank.

- Kozłowska, H., Honke, J., Sadowska, J., Frias, J., Vidal-Valverde, C. (1996). Natural fermentation of lentils. Influence of time, concentration and temperature on the kinetics of hydrolysis inositol phosphates. *Journal of Science and Food Agriculture*, 71, 367-375.
- Kuba, M., Tanaka, K., Tawata, S., Takeda, Y., Yasuda, M. (2003). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from tofuyo fermented soybean food. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 67, 1278-1283.
- Kuo, L. C., Cheng, W. Y., Wu, R. Y., Huang, C. J., Lee, K. T. (2006). Hydrolysis of black soybean isoflavone glycosides by *Bacillus subtilis* natto. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 314-320.
- Kuo, L. C., Wu, R. Y., Lee, K. T. (2012). A process for high-efficiency isoflavone deglycosylation using *Bacillus subtilis* natto NTU-18. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, 1181–1188.
- Kuo, Y. H., Rozan, P., Lambein, F., Frias, J., Vidal-Valverde, C. (2004). Effects of different germination conditions on the contents of free protein and non-protein amino acids of commercial legumes. *Food Chemistry*, 86, 537-545.
- Kurek-Górecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Górecki, M., Stojko, J., Sosada, M., Świerczek-Zięba, G. (2014). Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules*, 19, 78-101.
- Lambert, R.L., Stratford, M. (1999). Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 157-164.
- Lea, P. J., Sodek, L., Parry, M. A., Shewry, P. R., Halford, N. G. (2007). Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology*, 150, 1–26.
- Lee, B. H., Lo, Y. H., Pan, T. M. (2013). Anti-obesity activity of *Lactobacillus* fermented soy milk products. *Journal of Functional Foods*, 5, 905-913.

- Lee, C. H., Oh, S. H., Yang E. J., Kim, Y. S. (2006). Effects of raw, cooked and germinated small black soybean powders on dietary fibre content and gastrointestinal functions. *Food Science and Biotechnology*, 15, 635-638.
- Lee, Y. P., Mori, T. A., Puddey, I. B., Sipsas, S., Ackland, T. R., Beilin, L. J., Hodgson, J. M. (2009). Effects of lupin kernel flour-enriched bread on blood pressure: a controlled intervention study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89, 766-772.
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 67-78.
- Li, F. J., Yin, L. J., Cheng, Y. Q., Yamaki, K., Fan, J. F., Li, L. T. (2009). Comparison of Angiotensin I-converting enzyme inhibitor activities of pre-Fermented Douchi (a Chinese traditional fermented soybean food) started with various cultures. *International Journal of Food Engineering*, 5, 1556-3758.
- Li, G. H., Shi, Y. H., Liu, H., Le, G. W. (2006a). Antihypertensive effect of alcalase generated mung bean protein hydrolysates in spontaneously hypertensive rats. *European Food Research and Technology*, 222, 733-736.
- Li, G. H., Wan, J. Z., Le, G.W., Shi, Y. H. (2006b). Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from alcalase hydrolysate of mung bean protein. *Journal of Peptide Science*, 12, 509-514.
- Li, J., Brasier, A. R. (1996). Angiotensinogen gene activation by All is mediated by the Rel A (NF- $\kappa$ B p65) transcription factor: one mechanism for the renin angiotensin system (RAS) positive feedback loop in hepatocytes. *Molecular Endocrinology*, 10, 252-264
- Li, Y. H., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W. M., Liu, J. (2008). Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*, 106, 444-450.
- Liao, W. C., Wang, C. Y., Shyu, Y. T., Yu, R. C., Ho, K. C. (2013). Influence of preprocessing methods and fermentation of adzuki beans on  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) accumulation by lactic acid bacteria. *Journal of Functional Foods*, 5, 1108–1115.

- Lima, S. T., da Silva Nalin de Souza, B., França, A.K., Salgado Filho, N., Sichieri, R. (2013). Dietary approach to hypertension based on low glycaemic index and principles of DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension): a randomised trial in a primary care service. *The British Journal of Nutrition*, 110, 1472-1479.
- Lin, L., Harnly, J. M., Pastor-Corrales, M. S., Luthria, D. L. (2008). The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 107, 399-410.
- Lin, P. Y., Lai, H. M. (2006). Bioactive compounds in legumes and their germinated products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3807-3814.
- Liu, C. F., Tung, Y. T., Wu, C. L., Lee, B. H., Hsu, W. H., Pan, T. M. (2011). Antihypertensive effects of *Lactobacillus*-fermented milk orally administered to spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 4537–4543.
- Lo, W. M. Y., Li-Chan, E. C. Y. (2005). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from *in vitro* pepsin-pancreatin digestion of soy protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3369-3376.
- López, A., El-Naggar, T., Dueñas, M., Ortega, T., Estrella, E., Hernández, T., Gomez-Serranillos, M. P., Palomino, O. M., Carretero, M. E. (2013). Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 138, 547-555.
- Lopez-Amoros, M. L., Hernández, T., Estrella, I. (2006). Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 277-283.
- Luthria, D. L., Pastor Corrales, M. A. (2006). Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 205-211.
- Macz-Pop, G. A., Rivas-Gonzalo, J. C., Perez-Alonso, J. J., González-Paramás, A. M. (2006). Natural occurrence of free anthocyanin aglycones in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 94, 448-456.

- Madodé, Y. E., Nout, J. R., Bakker, E. J., Linnermann, A. R., Hounhouigan, K. J., Boekel, A. J. S. (2013). Enhancing the digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata*) by traditional processing and fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 54, 186-193.
- Malashree, L., Dagar, S. S., Kumar, S., Puniya, A. K. (2012).  $\beta$ -Glucosidase activity of lactobacilli for biotransformation of soy isoflavones. *Food Biotechnology*, 26, 154–163.
- Mallikarjun-Gouda, K. G., Gowda, L. R., Rao, A.G.A., Prakash, V. (2006). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from glycinin, the 11S globulin of soybean (*Glycine max*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4568-4573.
- Mansego, M. L., Redon, J., Martinez-Hervas, S., Real, J. T., Martinez, F., Blesa, S., Gonzalez-Albert, V., Saez, G. T., Carmena, R., Chaves, F. J. (2011). Different Impacts of cardiovascular risk factors on oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 6146-6163.
- Manzoni, C., Duranti, M., Eberini, I., Scharnag, H., März, W., Castiglioni, S., Lovati, M.R. (2003). Subcellular localization of soybean 7S globulin in HepG2 cells and LDL receptor up-regulation by its  $\alpha'$  constituent subunit. *Journal of Nutrition*, 133, 2149-2155.
- Martín-Cabrejas, M. A., Díaz, M. F., Aguilera, Y., Benitez, V., Mollá, E., Esteban, R. M. (2008). Influence of germination on the soluble carbohydrates and dietary fibre fractions in non-conventional legumes. *Food Chemistry*, 107, 1045-1052.
- Martín-Cabrejas, M. A., Sanfiz, B., Vidal, A., Mollá, E., Esteban, R., López-Andreu, J. (2004). Effect of fermentation and autoclaving on dietary fiber fractions and antinutritional factors of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 261-266.
- Martinez-Gonzalez, M. A., Bes-Rastrollo, M., Serra-Majem, L., Lairon, D., Estruch, R., Trichopoulou, A. (2009). Mediterranean food pattern and the primary prevention of chronic disease: Recent developments. *Nutrition Reviews*, 67, S111-S116.
- Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., Vidal-Valverde, C. (2008). Alpha-galactosides: antinutritional factors or functional ingredients?. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 48, 301-316.

- Martínez-Villaluenga, C., Kuo, Y-H., Lambein, F., Frias, J., Vidal-Valverde, C. (2006). Kinetics of free amino acids, free non-protein amino acids and trigonelline in soybean (*Glycine max* L.) and lupin (*Lupinus angustifolius* L.) sprouts. *European Food Research and Technology*, 224, 177-186.
- Martinez-Villaluenga, C., Torino, M.I., Martin, V., Arroyo, R., Garcia-Mora, P., Estrella-Pedrola, I., Vidal-Valverde, C., Rodriguez, J.M., Frias, J. (2012). Multifunctional Properties of Soy Milk Fermented by *Enterococcus faecium* Strains Isolated from raw soy milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10235-10244.
- Mbithi Mwikya, S., Van Camp, J., Rodriguez, R., Huyghebaert, A. (2001). Effects of sprouting on nutrient and antinutrient composition of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* var. Rose coco). *European Food Research Technology*, 212, 188–191.
- McCue, R.S., Kwon, Y.I., Shetty, K. (2005). Antidiabetic and antihypertensive potential of sprouted and solid-state bioprocessed soybean. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 14, 145-152.
- McDonald, L.C., Fleming, H.P., Hassan, H.M. (1990). Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 2120-2124.
- Medina-Godoy, S., Ambriz-Perez, D. L., Fuentes-Gutierrez, C. I., German-Baez, L. J., Gutierrez-Dorado, R., Reyes-Moreno, C., Valdez-Ortiz, A. (2012). Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidative activities and functional characterization of protein hydrolysates of hard-to-cook chickpeas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 1974-1981.
- Meldrum, B.S., Chapman, A.G. (1999). Basic mechanisms of Gabitril (tiagabine) and future potential developments. *Epilepsia*, 40, 2-6.
- Menrad, K. (2003). Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering*, 56, 181–188.
- Mitjavila, M.T., Moreno, J.J. (2012). The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases. *Biochemical Pharmacology*, 84, 1113-1122.

- Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47, 171-182.
- Montezano, A. C., Touyz, R. M. (2014). Reactive oxygen species, vascular noxs, and hypertension: Focus on translational and clinical research. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20, 164-182.
- Mukai, Y., Sato, S. (2009). Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) extract attenuates blood pressure elevation and modulates nitric oxide synthase and caveolin-1 expressions in rats with hypertension. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 19, 491-497.
- Mwikya, S. M., Camp, J. V., Rodriguez, R., Huyghebaert, A. (2001). Effects of sprouting on nutrient and antinutrient composition of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* var. Rose coco). *European Food Research Technology*, 212, 188-191.
- Nakahara, T., Sano, A., Yamaguchi, H., Sugimoto, K., Chikata, H., Kinoshita, E., Uchida, R. (2010a). Antihypertensive Effect of Peptide-Enriched Soy Sauce-Like Seasoning and Identification of Its Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Substances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 821-827.
- Nakahara, T., Sano, A., Yamaguchi, H., Sugimoto, K., Chikata, H., Kinoshita, E., Uchida, R. (2010b). Correction to antihypertensive effect of peptide-enriched soy sauce-like seasoning and identification of its angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 821-827.
- NAOS, 2009: [http://www.naos.aesan.msps.es/naos/ficheros/estrategia/Memoria\\_Plan\\_de\\_reduccion\\_del\\_consumo\\_de\\_sal\\_-\\_Jornadas\\_de\\_debate.pdf](http://www.naos.aesan.msps.es/naos/ficheros/estrategia/Memoria_Plan_de_reduccion_del_consumo_de_sal_-_Jornadas_de_debate.pdf)
- Nazif, N. M., El-Sayed, S. T. (2008). New antihypertensive peptides derived from protein by digestion. *Advances in Food Sciences*, 30, 185-191.
- Nelson, K., Stojanovska, L., Vasiljevic, T., Mathai, M. (2013). Germinated grains: A superior whole grain functional food?. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 91, 429-441.



- Ni, H., Li, L., Liu, G., Hu, S. Q. (2012). Inhibition mechanism and model of an angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory hexapeptide from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *PlosOne*, 7, e37077.
- Nichols, M., Townsend, N., Luengo-Fernandez, R., Leal, J., Gray, A., Scarborough, P., Rayner, M. (2012). European Cardiovascular Disease Statistics (2012). European Heart Network, Brussels, European Society of Cardiology, Sophia Antipolis.
- Nishino, T., Okamoto, K., Eger, B.T., Pai, E. F., Nishino, T. (2008). Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS Letters*, 275, 3278-3289.
- Niveditha, V. R., Sridhar, K. R. (2014). Antioxidant activity of raw, cooked and *Rhizopus oligosporus* fermented beans of *Canavalia* of coastal sand dunes of Southwest India. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 3253-3260.
- Niveditha, V. R., Sridhar, K. R., Chatra, S. K. R. (2012). Fatty acid composition of cooked and fermented beans of the wild legumes (*Canavalia*) of coastal sand dunes. *International Food Research Journal*, 19, 1401-1407.
- No, H. K., Lee, K. S., Kim, I. D., Park, M. J., Kim, S. D., Meyers, S. P. (2003). Chitosan treatment affects yield, ascorbic acid content, and hardness of soybean sprouts. *Journal of Food Science*, 68, 680-685.
- Nonogaki, H., Bassel, G. W. (2010). Germination-still a mystery. *Plant Science*, 179, 574-581.
- Oboh, G., Ademiluyi, A. O., Akindahunsi, A. A. (2009). Changes in polyphenols distribution and antioxidant activity during fermentation of some underutilized legumes. *Food Science and Technology International*, 15, 41-46.
- Oh, S. -H. (2003). Stimulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid synthesis activity in brown rice by a chitosan/glutamic acid germination solution and calcium/calmodulin. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36, 319-325.

- Ojeda, D., Jimenez-Ferrer, E., Zamilpa, A., Herrera-Arellano, A., Tortoriello, J., Alvarez, L. (2010). Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 7-10.
- Okamoto, A., Hanagata, H., Kawamura, Y., Yanagida, F. (1995). Anti-hypertensive substances in fermented soybean, natto. *Plant Foods for Human Nutrition*, 47, 39-47.
- Oomah, B. D., Caspar, F., Malcolmson, L. J., Bellido, A. S. (2011). Phenolics and antioxidant activity of lentil and pea hulls. *Food Research International*, 44, 436-441.
- Oomah, B. D., Corbe, A., Balasubramanian, P. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8225-8230.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2013). A global brief of hypertension. Document number: WHO/DCO/WHO/2013.2.
- Osborne, T. B. (1924). *The vegetable proteins*. London: Longmans Green and Co.
- Pacurari, M., Kafoury, R., Tchounwou, P. B., Ndebele, K. (2014). The Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Vascular Inflammation and Remodeling. *International Journal of Inflammation*, Article ID 689360, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/689360>.
- Pajak, P., Socha, R., Galkowska, D., Roznowski, J., Fortuna, T. (2014). Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. *Food Chemistry*, 143, 300-306.
- Park, K. B., Oh, S. H. (2006). Enhancement of  $\gamma$ -aminobutyric acid production in Chungkukjang by applying a *Bacillus subtilis* strain expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis*. *Biotechnology Letters*, 28, 1459-1463.
- Park, S. Y., Lee, J. S., Baek, H. H., Lee, H. G. (2010). Purification and characterization of antioxidant peptides from soy protein hydrolysate. *Journal of Food Biochemistry*, 34, 120-132.

- Parra, G., Quiroz, Y., Salazar, J., Bravo, Y., Pons, H., Chavez, M., Johnson, R.J., Rodriguez-Iturbe, B. (2008). Experimental induction of salt-sensitive hypertension is associated with lymphocyte proliferative response to HSP70. *Kidney International*, 74 (Suppl 111), S55–S59.
- Paucar-Menacho, L. M., Berhow, M. A., Gontijo Mandarino, J. M., Chang, Y. K., Gonzalez de Mejia, E. (2010). Effect of time and temperature on bioactive compounds in germinated Brazilian soybean cultivar BRS 258. *Food Research International*, 43, 1856–1865.
- Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., Vioque, J. (2002). Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 960-965.
- Pérez-Balibrea, S., Moreno, D.A., García-Viguera, C. (2011). Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation. *Food Chemistry*, 129, 35-44.
- Peters, J. (1995). Molecular basis of human hypertension: the role of angiotensin. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 3, 657-678.
- Pilvi, T. K., Jauhiainen, T., Cheng, Z. J., Mervaala, E. M., Vapaatalo, H., Korpela, R. (2006). Lupin protein attenuates the development of hypertension and normalises the vascular function of NaCl-loaded Goto-Kakizaki rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 57, 167-176.
- Pons, H., Ferrebuz, A., Quiroz, Y., Romero-Vasquez, F., Parra, G., Johnson, R. J., Rodriguez-Iturbe, B. (2013). Immune reactivity to heat shock protein 70 expressed in the kidney is cause of salt sensitive hypertension. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 304, F289–F299.
- Poulev, A., O'Neal, J. M., Logendra, S., Pouleva, R. B., Timeva, V., Garvey, A. S., Gleba, D., Jenkins, I. S., Halpern, B. T., Kneer, R., Cragg, G.M., Raskin, L. (2003). Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 2542–2547.

- Pouliot-Mathieu, K., Gardner-Fortier, C., Lemieux, S., St-Gelais, D., Champagne, C. P., Vuilleumard, J.C. (2013). Effect of cheese containing gamma-aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria on blood pressure in men. *PharmaNutrition*, 1, 141-148.
- Pownall, T. L., Udenigwe, C. C., Aluko, R. E. (2010). Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4712–4718.
- Pradeep, S. R., Manisha, G., Malleshi, N. G. (2011). Germinated mills and legumes as a source of gamma-aminobutyric acid. *World Applied Sciences Journal*, 14, 108-113.
- Pryde, P. G., Sedman, A. B, Nugent, C. E., Barr, M. (1993). Angiotensin-converting enzyme inhibitor fetopathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 3, 1575–1582.
- Quinhone-Júnior, A., Ida, E. I. (2015). Profile of the contents of different forms of soybean isoflavones and the effect of germination time of the compounds and the physical parameters in soybean sprouts. *Food Chemistry*, 166, 173-178.
- Ramos, C. L., Thorsen, L., Ryssel, M., Nielsen, D. S., Siegumfeldt, H., Schwan, R. F., Jespersen, L. (2014). Effect of the gastrointestinal environment on pH homeostasis of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* cells as measured by real-time fluorescence ratio-imaging microscopy. *Research in Microbiology*, 165, 215-225.
- Randhir, R., Kwon, Y.-I., Shetty, K. (2009). Improved health-relevant functionality in dark germinated *Mucuna pruriens* sprouts by elicitation with peptide and phytochemical elicitors. *Bioresource Technology*, 100, 4507–4514.
- Randhir, R., Lin, Y.T, Shetty, K. (2004). Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry*, 39, 637-646.
- Randhir, R., Shetty, K. (2003). Light-mediated fava bean (*Vicia faba*) response to phytochemical and protein elicitors and consequences on nutraceutical enhancement and seed vigour. *Process Biochemistry*, 38, 945-952.

- Randhir, R., Shetty, K. (2007). Elicitation of the proline-linked pentose phosphate pathway metabolites and antioxidant enzyme response by ascorbic acid in dark germinated fava bean sprouts. *Journal of Food Biochemistry*, 31, 485-508.
- Reddy, S. S., Krishnan, C. (2013). Characterization of enzyme released antioxidant phenolic acids and xylooligosaccharides from different *Graminaceae* or *Poaceae* members. *Food Biotechnology*, 27, 357–370.
- Rehm, S. *Multilingual Dictionary of Agronomic Plants*. (1994). Kluwer Academic Publishers: The Netherlands.
- Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gomez, M., Loarca-Piña, G. (2006). Bioactive components in common beans (*Phaseolus vulgaris*). *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, 217-236.
- Rho, S. J., Lee, J. S., Chung, Y. I., Kim, Y. W., Lee, H. G. (2009). Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from fermented soybean extract. *Process Biochemistry*, 44, 490-493.
- Rhodes, D. (2009). HORT640 - Metabolic Plant Physiology. Department of Horticulture and Landscape Architecture. Purdue University.
- Rhyu, M. R., Kim, E. Y., Han, J. S. (2002). Antihypertensive effect of the soybean paste fermented with the fungus *Monascus*. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 585–588.
- Riordan, J. F. (2003). Angiotensin I converting enzyme and its relatives. *Genome Biology*, 4. Article 225.
- Rocha-Guzmán, N. E., Herzog, A., González-Laredo, R. F., Ibarra-Pérez, F. J., Zambrano-Galván, G., Gallegos-Infante, J. A. (2007). Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chemistry*, 103, 521-527.
- Rockland, L. B., Radke, T. M. (1981). Legume protein quality. *Food Technology*, 35, 79-82.

- Rodriguez, C., Frias, J., Vidal-Valverde, C., Hernández, A. (2007). Total chemically available (free and intrachain) lysine and furosine in pea, bean and lentil sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10275-10280.
- Rodriguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., de las Rivas, B., López de Felipe, F., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J. M., Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 79-90.
- Rodriguez, H., Landete, J. M., de las Rivas, B., Muñoz, R. (2008). Metabolism of food phenolic acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748. *Food Chemistry*, 107, 1393-1398.
- Ruggenenti, P., Cattaneo, D., Loriga, G., Ledda, F., Motterlini, N., Gherardi, G., Orisio, S., Remuzzi, G. (2009). Ameliorating hypertension and insulin resistance in subjects at increased cardiovascular risk: effects of acetyl-L-carnitine therapy. *Hypertension*, 54, 567-574.
- Rui, X., Boye, J. I., Simpson, B. K., Prasher, S.O. (2012). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of *Phaseolus vulgaris* bean hydrolysates: Effects of different thermal and enzymatic digestion treatments. *Food Research International*, 49, 739-746.
- Rumiyati, Jayasena, V., James, A. P. (2013). Total phenolic and phytosterol compounds and the radical scavenging activity of germinated Australian sweet lupin flour. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68, 352–357.
- Sacks, F. M., Svetkey, L. P., Vollmer, W. M., Appel, L. J., Bray, G. A., Harsha, D., Obarzanek, E., Conlin, P. R., Miller, E. R., Simons-Morton, D. G., Karanja, N., Lin, P.H. (2001). Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the dietary approaches to stop hypertension (DASH) diet. *New England Journal of Medicine*, 344, 3-10.
- Sáenz De Miera, L. E., Ramos, J., Pérez De La Vega, M. (2008). A comparative study of convicilin storage protein gene sequences in species of the tribe *Vicieae*. *Genome*, 5, 511-523.
- Saharan, K., Khetarpaul, N. (1994). Biological utilization of vegetable peas: Effect of cooking and varietal differences. *Plant Foods for Human Nutrition*, 45, 321-329.

- Saneei, P., Hashemipour, M., Kelishadi, R., Rajaei, S., Esmailzadeh, A. (2013). Effects of recommendations to follow the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet vs. usual dietary advice on childhood metabolic syndrome: A randomised cross-over clinical trial. *British Journal of Nutrition*, 110, 2250-2259.
- Sangronis, E., Machado, C. J. (2007). Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 116-120.
- Sarkar, P.K., Cook, P.E., Owens, J.D. (1993). *Bacillus* fermentation of soybeans. *The World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 9, 295-299.
- Satya-Narayan, V., Nair, P. M. (1990). Metabolism, enzyaology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. *Phytochemistry*, 29, 367–375.
- Savelkoul, F. H. M. G., Tamminga, S., Leenaars, P. P. A. M., Schering, J., TerMaat, D. W. (1994). The degradation of lectins, phaseolin and trypsin inhibitors during germination of white kidney beans, *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Foods for Human Nutrition*, 45, 213-222.
- Schiffrin, E. L. (2014). Immune mechanisms in hypertension and vascular injury. *Clinical Science*, 126, 267–274.
- Schillaci, G., Pirro, M. (2006). C-reactive protein in hypertension: clinical significance and predictive value. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 16, 500-508
- Schwartz, R.D. (1988). The GABA A receptor gated ion channel: Biochemical and pharmacological studies of structure and function. *Biochemical and Pharmacology*, 37, 3369.
- Sedek, M., Hébert, R.L., Kennedy, C.R., Burns, K.D., Touyz, R.M. (2009). Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NADPH oxidases. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 18, 122-7.
- Segura-Campos, M. R., Chel-Guerrero, L. A., Betancur-Ancona, D. A. (2010). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions extracted by ultrafiltration of cowpea *Vigna unguiculata* hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 2512-2518.



- Seidl, R., Cairns, N., Singewald, N., Kaehler, S. T., Lubec, G. (2001). Differences between GABA levels in Alzheimer's disease and Down syndrome with Alzheimer-like neuropathology. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 363, 139-145.
- Shetty, K., Wahlqvist, M. (2004). A model for the role of the proline-linked pentose-phosphate pathway in phenolic phytochemical bio-synthesis and mechanism of action for human health and environmental applications. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13, 1-24.
- Shetty, P., Atallah, M. T., Shetty K. (2003). Stimulation of total phenolics, L-DOPA and antioxidant activity through proline-linked pentose phosphate pathway in response to proline and its analogue in germinating fava beans (*Vicia faba*). *Process Biochemistry*, 38, 1707-1717.
- Shin, Z. I., Yu, R., Park, S. A., Chung, D. K., Ahn, C. W., Nam, H. S., Kim, K. S., Lee, H.J. (2001). His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity *in vivo*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3004–3009.
- Shizuka, F., Kido, Y., Nakazawa, T., Kitajima, H., Aizawa, C., Kayamura, H., Ichijo, N. (2004). Antihypertensive effect of gamma-amino butyric acid enriched soy products in spontaneously hypertensive rats. *Biofactors*, 22, 165-167.
- Shohag, M. J. I., Wei, Y., Yang, X. (2012). Changes of folate and other potential health-promoting phytochemicals in legume seeds as affected by germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 9137-9143.
- Siger, A., Czubinski, J., Kachlicki, P., Dwiecki, K., Lampart-Szczapa, E., Nogala-Kalucka, M. (2012). Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25, 190-197.
- Sima, A. V., Stancu, C. S., Simionescu, M. (2009). Vascular endothelium in atherosclerosis. *Cell and Tissue Research*, 335, 191–203.
- Siow, H. -L., Gan, C. -Y. (2013). Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from *Parkia speciosa* seeds. *Food Chemistry*, 141, 3435-3442.

- Siow, H. L., Gan, C. Y. (2013). Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from *Parkia speciosa* seeds. *Food Chemistry*, 141, 3435-3442.
- Sirtori, C. R., Galli, C., Anderson, J. W., Sirtori, E., Arnoldi, A. (2009). Functional foods for dyslipidaemia and cardiovascular risk prevention. *Nutrition Research Reviews*, 22, 244-261.
- Sites, C. K., Cooper, B. C., Toth, M. J., Gastaldelli, A., Arabshahi, A., Barnes, S. (2007). Effect of a daily supplement of soy protein on body composition and insulin secretion in postmenopausal women. *Fertility and Sterility*, 88, 1609-1617.
- Smetanska, I. (2008). Production of Secondary Metabolites Using Plant Cell Cultures Food Biotechnology. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 111, 187-228.
- Spanou, C. I., Veskoukis, A. S., Stagos, D., Liadaki, K., Aligiannis, N., Angelis, A., Kouretas, D. (2012). Effects of greek legume plant extracts on xanthine oxidase, catalase and superoxide dismutase activities. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 68, 37-45.
- Stamler, J., Elliott, P., Kesteloot, H., Nichols, R., Claey's, G., Dyer, A. R., Stamler, R. (1996). Inverse relation of dietary protein markers with blood pressure. Findings for 10,020 men and women in the INTERSALT Study. INTERSALT Cooperative Research Group. INTERNational study of SALT and blood pressure. *Circulation*, 94, 1629-1634.
- Starzyńska-Janiszewska, A., Stodolak, B., Duliński, R., Mickowska, B. (2012). The influence of inoculum composition on selected bioactive and nutritional parameters of grass pea tempeh obtained by mixed-culture fermentation with *Rhizopus oligosporus* and *Aspergillus oryzae* strains. *Food Science and Technology International*, 18, 113-122.
- Starzyńska-Janiszewska, A., Stodolak, B., Mickowska, B. (2014). Effect of controlled lactic acid fermentation on selected bioactive and nutritional parameters of tempeh obtained from unhulled common bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 359-366.
- Stuehr, D., Pou, S., Rosen, G. M. (2001). Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 14533-14536.

- Świeca, M., Baraniak, B. (2014a). Nutritional and antioxidant potential of lentil sprouts affected by elicitation with temperature stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 3306-3313.
- Świeca, M., Gawlik-Dziki, U., Kowalczyk, D., Złotek, U. (2012). Impact of germination time and type of illumination on the antioxidant compounds and antioxidant capacity of *Lens culinaris* sprouts. *Scientia Horticulturae*, 140, 87-95.
- Świeca, M., Sęczyk, Ł., Gawlik-Dziki, U. (2014b). Elicitation and precursor feeding as tools for the improvement of the phenolic content and antioxidant activity of lentil sprouts. *Food Chemistry*, 161, 288-295.
- Tabasco, R., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M. V., Peláez, C., Requena, T. (2011). Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: Resistance and metabolism. *Food Microbiology*, 28, 1345-1352.
- Tabera, J., Frias, J., Estrella, I., Villa, R., Vidal-Valverde, C. (1995). Natural fermentation of lentils. Influence of time, concentration and temperature on protein content, trypsin inhibitor activity and phenolic compound content. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 201, 587-591.
- Tajoddin, M., Manohar, S., Lalitha, J. (2014). Effect of soaking and germination on polyphenol content and polyphenol oxidase activity of mung bean (*Phaseolus aureus* L.) cultivars differing in seed color. *International Journal of Food Properties*, 17, 782-790.
- Talukdar, D. (2013). Antioxidant potential and type II diabetes related enzyme inhibition properties of raw and processed legumes in indian Himalayas. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3, 13-19.
- Tan, J., Tian, F., Lv, Y., Liu, W., Zhong, L., Liu, Y., Yang, L. (2013). Integration of QSAR modelling and QM/MM analysis to investigate functional food peptides with antihypertensive activity. *Molecular Simulation*, 39, 1000-1006.

- Teunissen-Beekman, K. F. M., Dopheide, J., Geleijnse, J. M., Bakker, S. J. L., Brink E. J., de Leeuw, P. W., van Baak, M. A. (2012). Protein supplementation lowers blood pressure in overweight adults: effect of dietary proteins on blood pressure (PROPRES) a randomized trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 95, 966-971.
- Tinoy J., Kizhakekuttu, T. J., Widlansky, M. E. (2010). Natural Antioxidants and Hypertension: Promise and Challenges. *Cardiovascular Therapy*, 28, e20-e32.
- Torres, A., Frias, J., Granito, M., Vidal-Valverde, C. (2006). Fermented pigeon pea (*Cajanus cajan*) ingredients in pasta products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6685-6691.
- Torres, A., Frias, J., Granito, M., Vidal-Valverde, C. (2007). Germinated *Cajanus cajan* seeds as ingredients in pasta products: Chemical, biological and sensory evaluation. *Food Chemistry*, 101, 202-211.
- Torres, A., Frias, J., Vidal-Valverde, C. (2005). Changes in chemical composition of lupin seeds (*Lupinus angustifolius*) after selective  $\alpha$ -galactoside extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2468-2474.
- Torruco-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martinez-Ayalac, A., Davila-Ortiz, G., Betancur-Ancona, D. (2009). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1597-1604.
- Tovar, J., Nilsson, A., Johansson, M., Björck, I. (2014). Combining functional features of whole-grain barley and legumes for dietary reduction of cardometabolic risk: a randomized cross-over intervention in mature women. *The British Journal of Nutrition*, 111, 706-714.
- Tovar, J., Nilsson, A., Johansson, M., Ekesbo, R., Aberg, A. M., Johansson, U., Björck, I. (2012). A diet based on multiple functional concepts improves cardiometabolic risk parameters in healthy subjects. *Nutrition and Metabolism*, 9, 29-40.
- Troszynska, A., Estrella, I., Lamparski, G., Hernandez, T., Amarowicz, R., Pegg, R. B. (2011). Relationship between the sensory quality of lentil (*Lens culinaris*) sprouts and their phenolic constituents. *Food Research International*, 44, 3195–3201.

- Tsai, J. S., Lin, Y. S., Pan, B. S., Chen, T. J. (2006). Antihypertensive peptides and gamma-aminobutyric acid from prozyme 6 facilitated lactic acid bacteria fermentation of soymilk. *Process Biochemistry*, 41, 1282-1288.
- Tung, Y. T., Lee, B. H., Liu, C. F., Pan, T. M. (2011). Optimization of culture condition for ACEI and GABA production by lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*, 76, 585–591.
- Turkmen, N., Sari, F., Velioglu, Y.S. (2005). The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry*, 93, 713-718.
- Urbano, G., López-Jurado, M., Frejnagel, S., Gómez-Villalva, E., Porres, J. M., Frías, J., Vidal-Valverde, C., Aranda, P. (2005). Nutritional assessment of raw and germinated pea (*Pisum sativum*, L.) protein and carbohydrate by *in vitro* and *in vivo* techniques. *Nutrition*, 21, 230-239.
- Vallabha, V. S., Tikku, P. K. (2014). Antihypertensive Peptides Derived from Soy Protein by Fermentation. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 20, 161-168.
- Vazquez-Prieto, M. A., Bettaieb, A., Haj, F. G., Fraga, C. G., Oteiza, P. I. (2012). (-)-Epicatechin prevents TNF $\alpha$ -induced activation of signaling cascades involved in inflammation and insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 527, 113-118.
- Veenstra, J. M., Duncan, A. M., Cryne, C. N., Deschambault, B. R., Boye, J. I., Benali, M., Marcotte, M., Tosh, S. M., Farnworth, E. R., Wright, A. J. (2010). Effect of pulse consumption on perceived flatulence and gastrointestinal function in healthy males. *Food Research International*, 43, 553–559.
- Vermeirssen, V., Augustijns, P., Morel, N., Van Camp, J., Opsomer, A., Verstraete, W. (2005). *In vitro* intestinal transport and antihypertensive activity of ACE inhibitory pea and whey digests. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 415-430.
- Vernaza, M. G., Dia, V. P., de Mejia, E. G., Chang, Y. K. (2012). Antioxidant and antiinflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. *Food Chemistry*, 134, 2217-2225.

- Vidal-Valverde, C., Frias, J., Esteban, R. (1992). Dietary fiber in processed lentils. *Journal of Food Science*, 57, 1161-1163
- Vidal-Valverde, C., Frias, J., Sierra, I., Blázquez, I., Lambein, F., Kuo, Y.H. (2002). New functional legume foods by germination: Effect on the nutritive value of beans, lentils and peas. *European Food Research and Technology*, 215, 472-477.
- Virdis, A., Dell'Agnello, U., Taddei, S. (2014). Impact of inflammation on vascular disease in hypertension. *Maturitas*, 78, 179–183.
- Vita, J. A. (2005). Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 292S-297S.
- Vollmer, W. M., Sacks, F. M., Ard, J., Appel, L. J., Bray, G. A., Simons-Morton, D. G., Conlin, P. R., Svetkey, L. P., Erlinger, T. P., Moore, T. J., Karanja, N.; DASH-Sodium Trial Collaborative Research Group. (2001). Effects of diet and sodium intake on blood pressure: Subgroup analysis of the DASH sodium trial. *Annals of Internal Medicine*, 135, 1019-1028.
- Vongpatanasin, W., Thomas, D. T., Schwartz, R., Cassis, L. A., Osborne-Lawrence, S. Hahner, L., Gibson, L. L., Black, S., Samols, D., Shaul, P. W. (2007). C-reactive protein causes down regulation of vascular angiotensin subtype 2 receptors and systolic hypertension in mice. *Circulation*, 115, 1020-1028.
- Wang, H., Zhang, S., Sun, Y., Dai, Y. (2013). ACE-Inhibitory Peptide Isolated from Fermented Soybean Meal as Functional Food. *International Journal of Food Engineering*, 9, 1-8.
- Weinberger, M. H., Fineberg, N. S., Fineberg, S. E., Weinberger, M. (2001). Salt sensitivity, pulse pressure, and death in normal and hypertensive humans. *Hypertension*, 37, 429-432.
- Weir, M. R. (2007). Effects of renin-angiotensin system inhibition on end-organ protection: Can we do better?. *Clinical Therapeutics*, 29, 1803-1824.

- Wendling, U., Paul, L., van der Zee, R., Prakken, B., Singh, M., van Eden, W. (2000). A conserved mycobacterial heat shock protein (hsp) 70 sequence prevents adjuvant arthritis upon nasal administration and induces IL-10-producing T cells that cross-react with the mammalian self-hsp70 homologue. *Journal of Immunology*, 164, 2711-2717.
- Wiander, B., Ryhänen, E. -L. (2005). Laboratory and large-scale fermentation of white cabbage into sauerkraut and sauerkraut juice by using starters in combination with mineral salt with a low NaCl content. *European Food Research and Technology*, 220, 191-195.
- Wong, C. G., Bottiglieri, T., Snead, O. C. (2003). GABA,  $\gamma$ -hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Annals of Neurology*, 54, 3-12.
- Wu, T., Ding, X. (2002). Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Research International*, 35, 367-375.
- Xiaohong, K., Jie, G., Zhaohui, X., Zhijun, Z., Hua, W., Xu, W. (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology*. 50, 591-598.
- Xu, B. J., Yuan, S. H., Chang, S. K. C. (2007b). Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. *Journal of Food Science*, 72, 167-177.
- Xu, B.J., Chang, S.K.C. (2007a). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, 72, S159-S166.
- Yamakoshi, J., Fukuda, S., Satoh, T., Tsuji, R., Saito, M., Obata, A., Matsuyama, A., Kikuchi, M., Kawasaki, T. (2007). Antihypertensive and natriuretic effects of less-sodium soy sauce containing gamma-aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 165-173



- Yang, R., Guo, Q., Gu, Z. (2013). GABA shunt and polyamine degradation pathway on  $\gamma$ -aminobutyric acid accumulation in germinating fava bean (*Vicia faba* L.) under hypoxia. *Food Chemistry*, 136, 152-159.
- Yao, F., Sun, C., Chang, S.K.C. (2012). Lentil polyphenol extract prevents angiotensin II-induced hypertension, vascular remodelling and perivascular fibrosis. *Food and Function*, 3, 127-133.
- Ye, N., Zhang, J. (2012). Antagonism between abscisic acid and gibberellins is partially mediated by ascorbic acid during seed germination in rice. *Plant Signaling & Behavior*, 7, 563-565.
- Yonekura, M., Ichinura, T., Nishikawa, M. (2005). Isolation and application of physiologically active peptides from soybean whey and okara proteins (Part III). *Soy Protein Research Japan*, 8, 97-102.
- Yust, M. M., Pedroche, J., Giron-Calle, J., Alaiz, M., Millan, F., Vioque, J. (2003). Production of ACE inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chemistry*, 81, 363-369.
- Zakharov, A., Carchilan, M., Stepurina, T., Rotari, V., Wilson, K., Vaintraub, I. (2004). A comparative study of the role of the major proteinases of germinated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds in the degradation of their storage proteins. *Journal of Experimental Botany*, 55, 2241-2249.
- Zaman, M. A., Oparil, S., Calhoun, D. A. (2002). Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1, 621-636.
- Zhang, J. H., Tatsumi, E., Ding, C. H., Li, L. T. (2006). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides in douchi, a Chinese traditional fermented soybean product. *Food Chemistry*, 98, 551-557.
- Zhao, Y., Du, S. K., Wang, H., Cai, M. (2014). *In vitro* antioxidant activity of extracts from common legumes. *Food Chemistry*, 152, 462-466.

- Zhu, X.L., Watanabe, K., Shiraishi, K., Ueki, T., Noda, Y., Matsui, T., Matsumoto, K. (2008). Identification of ACE-inhibitory peptides in salt-free soy sauce that are transportable across caco-2 cell monolayers. *Peptides*, 29, 338-344.
- Zielinski, H. (2003). Contribution of low molecular weight antioxidants to the antioxidant screen of germinated soybean seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58, 1–20.